



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA E
TEOR EM FENÓIS DE DIFERENTES EXTRATOS
DE PALMEIRA ANÃ (*CHAMAEROPS HUMILIS* L.)**

Joana Cristina Pereira Medronho

Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sob a orientação de Professora Doutora Anabela
Romano e co-orientação de Doutora Sandra Gonçalves

Faro

2015

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA E
TEOR EM FENÓIS DE DIFERENTES EXTRATOS
DE PALMEIRA ANÃ (*CHAMAEROPS HUMILIS* L.)**

Joana Cristina Pereira Medronho

Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sob a orientação de Professora Doutora Anabela
Romano e co-orientação de Doutora Sandra Gonçalves

Faro

2015

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA E TEOR EM FENÓIS DE DIFERENTES EXTRATOS DE PALMEIRA ANÃ (*CHAMAEROPS HUMILIS* L.)

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Declaração de Autoria do Trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Joana Cristina Pereira Medronho

Direitos de cópia

© **Copyright:** (Joana Cristina Pereira Medronho)

A universidade do algarve tem direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

No percurso deste período de estudo e trabalho que agora termina participaram várias pessoas que merecem o meu sincero agradecimento, sem as quais esta dissertação não estaria completa. Queria então prestar o meu agradecimento:

À **Professora Doutora Anabela Romano** por me ter proporcionado condições para a realização deste trabalho e pela excelente orientação, pelo apoio, disponibilidade e simpatia.

À **Doutora Sandra Gonçalves** por todo o apoio, disponibilidade, simpatia e muita paciência. Queria agradecer também as suas críticas construtivas e enriquecedoras que foram um estimulante para a realização deste trabalho não esquecendo todo o tempo que sempre disponibilizou desde o início deste trabalho.

Às Professoras Doutoras Paula Andrade e Patrícia Valentão, do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, pela colaboração na análise do perfil fenólico dos extratos.

À minha colega de laboratório, Elsa Moreira, pela sua ajuda e apoio, pelas discussões enriquecedoras e pelo espírito de entreajuda.

Aos restantes colegas de laboratório pela amabilidade, boa disposição e pelo espírito de equipa.

Ao meu irmão pelo seu apoio e pelas suas críticas construtivas que me ajudaram em certos momentos deste caminho.

Aos meus pais e avós pela força, incentivo e apoio que sempre me deram, tornando este longo percurso um pouco mais fácil. Obrigada por terem acreditado em mim.

Por último agradeço, aos meus amigos que sempre estiveram comigo nos momentos bons e menos bons.

E, por fim, a todos aqueles que, de uma forma mais ou menos direta, me apoiaram ao longo desta caminhada.

Muito obrigada!

“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder o entusiasmo.”

(Winston Churchill)

Abreviaturas

Abs: Absorvência

ABTS: 2,2'-Azino-bis-3- etilbenzolina-6-sulfónico

ACh: Acetilcolina

AChE: Acetilcolinesterase

ATCi: Iodeto de acetilcolina

BChE: Butirilcolinesterase

BHT: Butil-hidroxitolueno

BTCi: Iodeto de butirilcolina

ChEs: Colinesterases

DA: Doença de Alzheimer

DP: Doença de Parkinson

DPPH: 2,2-Difenil-1-picrilhidrazila

DTNB: Ácido 5-5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico)

EAA: Equivalentes de ácido ascórbico

EAG: Equivalentes de ácido gálico

EQ: Equivalentes de quercetina

ET: Equivalentes de Trolox

ET: *Electron Transfer*

EUA: Extração assistida por ultrassons

F-C: Folin-Ciocalteu

FRAP: *Ferric Reducing Antioxidant Power*

HAT: *Hydrogen Atom Transfer*

HPLC-DAD: Cromatografia Líquida de Alta Performance com Detecção por Arranjo de Díodos

IC₅₀: Concentração mínima necessária para inibir 50 %

ROS: *Reactive oxygen species* (espécies reativas de oxigénio)

TCA: Ácido tricloroacético

TEAC: *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*

Trolox: Ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano

TYR: Tirosinase

Resumo

Chamaerops humilis L. (Arecaceae) é um tipo de palmeira que cresce ao longo da zona do mediterrâneo. Esta planta tem potencial medicinal embora as suas propriedades estejam ainda pouco investigadas. Este trabalho teve como objetivo analisar o teor em fenóis, a atividade antioxidante e a capacidade inibitória de enzimas relacionadas com as doenças de Alzheimer e Parkinson, de diferentes extratos de *C. humilis*. Inicialmente prepararam-se extratos metanólicos por maceração a partir de folhas, sementes, pele e polpa dos frutos. Os teores em fenóis e flavonoides totais presentes nos extratos foram avaliados pelos métodos Folin-Ciocalteu (F-C) e do cloreto de alumínio ($AlCl_3$), respetivamente. A capacidade antioxidante foi avaliada pelos métodos do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (TEAC) e *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP). Além disso, foi também testada a capacidade dos extratos para inibir a atividade dos enzimas acetilcolinesterase (AChE), butirilcolinesterase (BChE) e tirosinase (TYR). Os quatro extratos analisados demonstraram elevada bioatividade e teor em fenóis, sendo os melhores resultados obtidos no extrato preparado a partir de sementes. Numa fase posterior foi testado o efeito de diferentes condições de extração no teor em fenóis e atividade antioxidante de extratos preparados a partir desse tipo de material vegetal. Verificou-se que a concentração de metanol utilizada influenciou fortemente o teor em fenóis dos extratos e a sua atividade antioxidante, variando a concentração mais adequada com a técnica utilizada. Além disso, verificou-se que utilizando períodos curtos de extração é possível extrair elevada quantidade de compostos com atividade antioxidante. Em suma, os resultados obtidos neste trabalho indicam que os extratos de *C. humilis*, particularmente de sementes, possuem potencial como fonte de compostos com atividade farmacológica.

Palavras-chave: Antioxidantes; Doenças neurodegenerativas; Enzimas; Fenóis; Radicais livres

Abstract

Chamaerops humilis L. (Arecaceae) is a palm that grows along the Mediterranean area. This plant has medicinal potential but their properties are still poorly investigated. This dissertation aimed to analyze the phenolic content, the antioxidant activity and the inhibitory capacity of enzymes linked with Alzheimer's and Parkinson disease, of different *C. humilis* extracts. Firstly, methanol extracts from leaves, seeds, and fruits' pulps and peels were prepared using maceration. The total phenolics and flavonoids contents of the extracts were evaluated by Folin-Ciocalteu (F-C) and aluminum chloride ($AlCl_3$) methods, respectively. The antioxidant capacity was evaluated by the 2,2-diphenyl-1-picryl-hidrazila (DPPH), Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP), assays. In addition, the ability of the extracts to inhibit the activity of the enzymes acetylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase (BChE), and tyrosinase (TYR), was also evaluated. All the extracts analyzed showed high phenolic contents and strong bioactivity although the best results have been obtained in the seeds extract. At a later stage, the effect of different extraction conditions on phenolic contents and antioxidant activity of seeds extracts was tested. It was found that the concentration of methanol strongly influences the content of phenolics and the antioxidant activity, varying the most adequate concentration with the the technique used. Furthermore, it was found that using short periods it is possible to extract large amount of compounds with antioxidant activity. In conclusion, the results of this study indicate that *C. humilis* extracts, particularly the seeds extract, have potential as a source of compounds with pharmacological activity.

Keywords: Antioxidants; Neurodegenerative disorders; Enzymes; Phenolic compounds; Free radicals

Índice Geral

1. Introdução	1
1.1. Stresse oxidativo e doenças neurodegenerativas	1
1.2. Antioxidantes	4
1.2.1. Métodos de análise da atividade antioxidante	6
1.3. Extração de compostos vegetais	10
1.4. <i>Chamaerops humilis</i> L.	12
1.5. Objetivos	14
2. Materiais e Métodos	15
2.1. Material Vegetal	15
2.2. Preparação dos extratos vegetais	15
2.3. Atividade antioxidante	15
2.3.1. Método do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)	15
2.3.2. Método <i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i> (TEAC)	16
2.3.3. Avaliação da capacidade para reduzir o ferro (FRAP)	17
2.4. Teor em fenóis totais – método F-C	17
2.5. Teor em flavonoides totais – método do AlCl_3	17
2.6. Atividade inibitória da acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE)	18
2.7. Ensaio da atividade inibitória da tirosinase (TYR)	19
2.8. Cromatografia Líquida de Alta Performance com Detecção por Arranjo de Díodos (HPLC-DAD)	19
2.9. Análise estatística e tratamento de dados	20
3. Resultados e Discussão	21
3.1. Avaliação da atividade biológica e teor em fenóis de diferentes extratos de <i>C. humilis</i>	21
3.1.1. Avaliação da capacidade antioxidante	21
3.1.2. Inibição <i>in vitro</i> dos enzimas AChE, BChE e TYR	25
3.1.3. Quantificação do teor total em fenóis e em flavonoides	29

3.2. Efeito da concentração de metanol e tempo de extração na capacidade antioxidante e teor em fenóis de extratos de semente	36
3.3. Atividade antioxidante e teor em fenóis de extratos de semente obtidos por extração assistida por ultrassons	40
4. Conclusões e Perspetivas Futuras	44
5. Referências Bibliográficas	46

Índice de figuras

Figura 1. Redução tetravalente do oxigénio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água (H_2O) e dos compostos intermediários (Ferreira & Matsubara, 1997).	2
Figura 2. Representação da redução do DPPH (Molyneux, 2004).	8
Figura 3. <i>Chamaerops humilis</i> L. A: aspeto geral da planta (Autor: Tomás Grevenstuck); B: pormenor da folha (Autor: Pedro Pinho; http://www.flora-on.pt) e C: frutos (Autor: Anabela Romano).	12
Figura 4 Distribuição geográfica de <i>C. humilis</i> representada a vermelho (Fonte: http://www.plantapalm.com).	13
Figura 5. Avaliação da atividade antioxidante dos diferentes extratos de <i>Chamaerops humilis</i> através dos métodos DPPH, TEAC e FRAP. Os valores representam a média \pm o erro padrão de três repetições. No mesmo gráfico, valores seguidos de letras diferentes representam médias significativamente diferentes de acordo com o teste de Duncan ($P < 0,05$). Controlo positivo no ensaio DPPH (BHT): $IC_{50} = 462.24 \pm 0.03 \mu g/ml$	23
Figura 6. Inibição da atividade das enzimas AChE, BChE e TYR in vitro pelos diferentes extratos de <i>Chamaerops humilis</i> . Os valores representam a média \pm o erro padrão de três repetições. No mesmo gráfico, valores seguidos de letras diferentes representam médias significativamente diferentes de acordo com o teste de Duncan ($P < 0,05$). Controlo positivo nos ensaios anti-ChEs (galantamina): $IC_{50} = 2.20 \pm 0.04$ e $11.72 \pm 1.09 \mu g/ml$ para a AChE e BChE, respetivamente; controlo positivo no ensaio anti-TYR (ácido kójico): $94,46 \pm 1,20 \%$ de inibição a $200 \mu g/ml$	27
Figura 7. Quantificação do teor em fenóis (em cima) e em flavonoides (em baixo) dos diferentes extratos de <i>Chamaerops humilis</i> obtidos por maceração. Os valores representam a média \pm o erro padrão de três repetições. No mesmo gráfico, valores seguidos de letras diferentes representam médias significativamente diferentes de acordo com o teste de Duncan ($P < 0,05$).	30
Figura 8. Cromatograma de HPLC para o extrato de folhas de <i>Chamaerops humilis</i> ($\lambda = 350$ nm). O número correspondente a cada pico encontra-se descrito na Tabela 1.	33
Figura 9. Cromatograma de HPLC para o extrato de polpa de <i>Chamaerops humilis</i> ($\lambda = 350$ nm). O número correspondente a cada pico encontra-se descrito na Tabela 1	34
Figura 10. Cromatograma de HPLC para o extrato de sementes de <i>Chamaerops humilis</i> ($\lambda = 280$ nm)	34
Figura 11. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de sementes de <i>Chamaerops humilis</i> obtidos por maceração com MeOH a diferentes concentrações (0, 50 e 100%) durante 60 min e 24 h. Os valores representam a média \pm o erro padrão de três repetições. Para cada	

período de extração foi efetuada uma comparação estatística entre os solventes, letras diferentes representam médias significativamente diferentes pelo Teste de Duncan ($P < 0,05$). Para cada concentração de MeOH, valores assinalados com * representam médias significativamente diferentes entre os dois períodos de tempo pelo Teste T ($P < 0,05$). 37

Figura 12. Quantificação do teor em fenóis dos extratos de sementes de *Chamaerops humilis* obtidos por maceração com diferentes solventes a diferentes períodos de tempo. Os valores representam a média \pm o erro padrão de três repetições. Para cada período de extração foi efetuada uma comparação estatística entre os solventes, letras diferentes representam médias significativamente diferentes pelo Teste de Duncan ($P < 0,05$). Para cada concentração de MeOH os valores assinalados com * representam médias significativamente diferentes entre os dois períodos de tempo pelo Teste T ($P < 0,05$). 39

Índice de tabelas

Tabela 1. Perfil fenólico de extratos de *Chamaerops humilis* (mg/g_{extrato}) por cromatografia líquida de alta pressão com detetor de matriz de diodo (HPLC-DAD). 33

Tabela 2. Atividade antioxidante (DPPH, TEAC e FRAP) e teor em fenóis totais em extratos de sementes de *Chamaerops humilis* obtidos por EAU. 41

1. Introdução

1.1. Stresse oxidativo e doenças neurodegenerativas

Os radicais livres têm um importante papel na progressão de diversas doenças, nomeadamente doenças cardiovasculares, cancro, cirrose, artrite, diabetes e distúrbios neuronais (Fearon & Faux, 2009). Felizmente, a formação de radicais livres pode ser reduzida através da ação de antioxidantes, que neutralizam os radicais livres (Halliwell, 2011). Estes são espécies químicas que apresentam um ou mais eletrões desemparelhados na última orbital. As espécies radicalares, uma vez que têm eletrões desemparelhados, apresentam maior reatividade do que as espécies com eletrões emparelhados (Halliwell, 1991).

O oxigénio molecular (O_2) que é de extrema importância para os organismos aeróbios, também tem um lado negativo, induzindo lesões celulares através das ROS (*reactive oxygen species*; espécies reativas de oxigénio), que progressivamente são responsáveis pela perda de funções celulares e/ou orgânicas (Mota, Figueiredo & Duarte, 2004). As ROS são encontradas em todos os sistemas biológicos e originadas nos organismos pelo processo metabólico normal. Através do metabolismo celular aeróbio, o O_2 sofre uma redução tetravalente, com aceitação de quatro eletrões resultando na formação de água (H_2O), são também formados intermediários reativos, sob a forma de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo ($\cdot OH$) e peróxido de hidrogénio (H_2O_2), como representado na figura 3 (Ferreira & Matsubara, 1997). A exposição do organismo a radicais livres, nomeadamente, a exposição às ROS faz com que o organismo desenvolva mecanismos de defesa antioxidante para eliminá-los. Um equilíbrio entre a produção de radicais livres pelo organismo e as defesas antioxidantes é essencial ao normal funcionamento do mesmo (Ferreira & Abreu, 2007). No entanto, quando esse equilíbrio é comprometido dá origem ao stresse oxidativo.

Segundo Martins & Mourato (2008) o stresse oxidativo é definido como “o conjunto de alterações fisiológicas, resultantes da ação direta ou indireta das ROS com ação inibitória de enzimas, e que afetam os processos metabólicos, nomeadamente a respiração, a fotossíntese, a fixação do CO_2 e as trocas gasosas”.

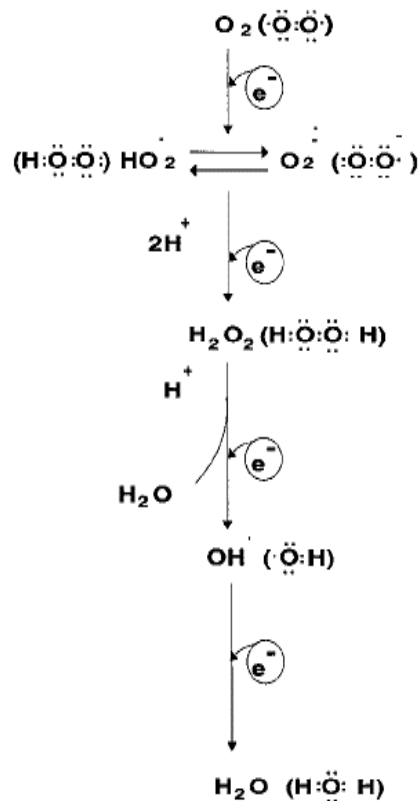


Figura 1. Redução tetraivalente do oxigénio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água (H_2O) e dos compostos intermediários (Ferreira & Matsubara, 1997).

Numa situação de stresse oxidativo ocorre produção de ROS em excesso que podem oxidar e danificar todo o tipo de biomoléculas, nomeadamente, lípidos celulares, proteínas, DNA e RNA, originando a sua modificação através de mutações, podendo levar à sua destruição e inibir a sua função normal (Carocho & Ferreira, 2013). Quando as plantas são sujeitas a condições adversas aumentam a produção de ROS provocando danos oxidativos nas células (Moller, Jensen & Hansson, 2007) assim como o aumento da taxa de mutações (Taiz & Zeiger, 1998).

Uma produção exagerada de ROS nos humanos, por fontes endógenas ou externas como poluentes, o fumo do tabaco e pesticidas, conduz ao stresse oxidativo (Gülçin, Oktay, Kufrevioglu & Aslan, 2003), que está implicado no processo de patogénese de várias doenças como cancro, processos inflamatórios, *diabetes mellitus*, doenças cardiovasculares, e também doenças neurológicas como a doença de Alzheimer (DA) e Parkinson (DP) (Kannan & Jain, 2000; Carocho & Ferreira, 2013).

O cérebro é o órgão do corpo humano mais vulnerável ao stresse oxidativo surgindo assim a hipótese de que o stresse oxidativo está envolvido em processos neurodegenerativos e na morte de células neuronais (Andersen, 2004). A DA é uma doença neurológica crónica resultante do mau funcionamento das funções bioquímicas (Ferreira, Proença, Serralheiro & Araújo 2006), nomeadamente a redução dos níveis de acetilcolina (ACh) no cérebro (Jaen, Gregor, Lee, Davis & Emmerling 1996). A ACh é um neurotransmissor, capaz de estabelecer impulsos nervosos entre as células, que após transmitir o impulso é inactivada primariamente pela acetilcolinesterase (AChE) e posteriormente pela butirilcolinesterase (BChE) (Hebert, Scherr & Beckeff, 1995). Dado o possível envolvimento da disfunção colinérgica com a DA, melhorar a neurotransmissão colinérgica, aumentando os níveis de ACh por inibição das colinesterases (ChEs) constitui uma base racional para o tratamento dos sintomas da doença (Felician & Sandson, 1999). No entanto, alguns inibidores de ChEs já utilizados para a terapêutica da DA revelaram hepatotoxicidade (Knapp, Knopman, Solomon, Pendlebury, Davis & Gracon, 1994), desde então tem havido uma contínua investigação para a descoberta de novos inibidores, nomeadamente os de origem natural extraídos das plantas (Perry, Houghton, Theobald, Jenner & Perry 2000; Tariot, Solomon, Morris, Kershaw, Lilienfeld, Ding et al., 2000; Tundis, Bonesi, Menichini & Loizzo, 2015).

O stresse oxidativo tem um importante papel na degeneração dos neurónios dopaminérgicos na DP (Dias, Junn & Mouradian, 2013). Esta é caracterizada em parte pela perda progressiva de grupos de neurónios de várias partes do cérebro, nomeadamente os neurónios dopaminérgicos (Greggio, Bergantino, Carter, Ahmad, Costin, Hearing et al., 2005). A dopamina é uma molécula instável que sofre auto-oxidação para formar dopamina quinonas e radicais livres. Esta reação é catalisada por metais, oxigénio e enzimas como a tirosinase (TYR) (Munoz, Huenchuguala, Paris & Segura-Aguilar, 2012). A TYR tem potencial para danificar os neurónios através do aumento da concentração das espécies radiculares derivadas da dopamina (Greggio et al., 2005), e por essa razão inúmeros inibidores deste enzima, tanto de origem natural como sintética, têm vindo a ser investigados. No entanto, surgiram preocupações face à toxicidade e efeitos secundários dos inibidores de origem sintética levando à procura de inibidores de origem natural (Zengin, Uysal, Ceylan & Aktumsek, 2015). Os compostos fenólicos têm demonstrado possuir capacidade inibitória da atividade da TYR que,

acrescida à sua elevada capacidade antioxidante, podem ser um grande contribuinte para a prevenção/tratamento desta doença neurodegenerativa (Chang, 2009).

A TYR desempenha também um papel importante na produção de pigmentos de melanina, que apesar de serem importantes para a prevenir os danos causados por UV na pele, uma produção exagerada de melanina pode conduzir a variações na pigmentação (Zengin et al., 2015). Assim, inibidores deste enzima podem ser também úteis para aplicação em produtos utilizados na prevenção da hiperpigmentação da pele (Kim & Uyama, 2005).

1.2. Antioxidantes

Antioxidantes são enzimas ou outras substâncias orgânicas, tais como a vitamina E ou o β -caroteno, que mesmo presentes em baixas concentrações relativamente a um substrato oxidável inibem ou previnem significativamente a oxidação desse mesmo substrato (Huang, Ou & Prior, 2005). Existem vários tipos de antioxidantes que podem ser classificados consoante os mecanismos associados. Estes podem ser preventivos, captadores ou reparadores. Um antioxidante preventivo é aquele que atua através da eliminação das ROS provocando inibição das reações de oxidação dos radicais livres, por sua vez um antioxidante captador remove espécies reativas para impedir o ataque a biomoléculas (como por exemplo ácido ascórbico). Por último, um antioxidante reparador corrige lesões, elimina resíduos ou reconstitui funções perdidas (como por exemplo as proteases e transferases) (Niki, 2010).

Os mecanismos de defesa antioxidante podem ser agrupados em enzimáticos ou não-enzimáticos (Augustyniak, Bartosz, Ipa, Duburs, Horakova & Uczaj, 2010). Os mecanismos enzimáticos são cascatas enzimáticas que levam à desintoxicação de ROS no organismo, podem ser igualmente divididos em dois grupos, uns que reagem diretamente com as ROS e outros que atuam como reguladores redox (Cipak, Lovakovic & Zarkovic, 2010). Por exemplo, a importância da catalase pode assim ser vista não só para a desintoxicação de H_2O_2 , mas consequentemente, na adaptação ao stresse oxidativo endógeno e peroxidação lipídica (Cipak, Jaganjac, Tehlivets, Kohlwein & Zarkovic, 2008), uma vez que a remoção de H_2O_2 pode modular a transdução de sinal e ser um gatilho para a proliferação de células tumorais dormentes

(Hyoudou, Nishikawa, Kobayashi, Umeyama, Yamashita & Hashida, 2006). Isto dá uma nova visão sobre a catalase como um modificador de resposta biológica fundamental de sinalização redox e homeostase oxidativo (Augustyniak et al., 2010).

Um sistema antioxidante não-enzimático nunca é tão específico como um enzimático, mas é este que atua numa primeira linha de defesa antioxidante, sendo assim importante na resposta celular às ROS. São exemplo deste sistema algumas vitaminas como a vitamina C e a vitamina E. A vitamina C suprime radicais formando o radical ascorbil, um radical estável que causa poucos danos oxidativos. A vitamina E é o nome genérico do grupo dos tocoferóis e tocotrienóis e é um eficiente inibidor da peroxidação lipídica *in vivo* (Barreiros, David & David, 2006). A vitamina E tem demonstrado estar envolvida no sinal da transdução através da modulação de enzimas específicas, por conseguinte, está envolvida no controlo de algumas funções celulares como a apoptose, necrose, adesão e diferenciação (Augustyniak et al., 2010).

Os antioxidantes são aplicados na alimentação com dois diferentes propósitos, o de suprimir a oxidação lipídica e a formação de radicais livres nos alimentos durante o armazenamento ou com o objetivo de reduzir a concentração de radicais livres *in vivo* após a ingestão dos alimentos (Makahleh, Saad & Bari, 2015). São, assim, bastante importantes nos setores alimentar e biotecnológico, uma vez que podem ser utilizados como aditivos alimentares e nutracéuticos, e como fármacos (Perry, Pickering, Wang, Houghton & Perru, 1999; Loziene, Venskutonis, Sipailiene & Labokas, 2007).

Os antioxidantes podem ser sintéticos ou de origem natural. Quanto aos antioxidantes sintéticos temos como exemplo, o butil-hidroxianisol (BHA) e o butil-hidroxitolueno (BHT), que são utilizados na conservação de alimentos, cosméticos e fármacos. No entanto, este tipo de antioxidantes são muito voláteis e instáveis a temperaturas elevadas, apresentam, também, alguns efeitos tóxicos e carcinogénicos (Shi, Noguchi & Niki, 2001; Seabra, Andrade, Valentão, Fernandes, Carvalho & Bastos, 2006). Assim, e embora os antioxidantes sintéticos sejam extensivamente utilizados, a sua segurança tem vindo a ser questionada (Shahidi & Zhong, 2005), estimulando a pesquisa de compostos naturais com propriedades antioxidantes dado o seu enorme espectro de aplicação e segurança para a saúde (Venskutonis, 2004; Shahidi & Zhong, 2005). Muitos compostos de origem natural têm sido exaustivamente estudados pelas suas propriedades antioxidantes (Frankel, 2005; Maestri, Nepote, Lamarque, Zygałło, 2006; Zhang, Yang, Zu, Chen, Wu, Wang et al., 2010).

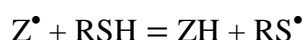
Muitas plantas contêm grandes quantidades de antioxidantes como os compostos fenólicos, que desempenham um importante papel na absorção e neutralização de radicais livres, assim como na decomposição de peróxidos (Anderson, Teuber, Gobeille, Cremin, Waterhouse & Steinberg, 2001). Os compostos fenólicos representam o maior grupo de metabolitos secundários das plantas, estão distribuídos globalmente pela planta e estão envolvidos na defesa contra as radiações ultravioleta ou a agressão por parte de agentes patogénicos (Manach, Scalbert, Morand, Remesy & Jimenez, 2004; Pereira, Valentão, Pereira & Andrade, 2009). O teor em compostos fenólicos numa planta pode ser afetado por fatores ambientais e edáficos, como o tipo de solo, a exposição ao sol ou à chuva (Pandey & Rizvi, 2009). Estes compostos podem ser classificados em diferentes grupos em função do número de anéis de fenol que contêm e tendo em conta os elementos estruturais que ligam os anéis uns aos outros (Manach et al., 2004). Os diferentes grupos incluem os ácidos fenólicos, os flavonoides, os taninos e as cumarinas (Manach et al., 2004; Balasundram, Sundram & Samman, 2006). A capacidade de captar radicais livres, como o $\cdot\text{OH}$, o H_2O_2 e o $\text{O}_2^{\cdot-}$, através de mecanismos de transferência de eletrões e átomos de hidrogénio eleva o potencial antioxidante dos compostos fenólicos (Halliwell, Clement & Long, 2000; Wright, Johnson & DiLabio, 2001). Vários estudos sugerem que a longo termo uma dieta rica em compostos fenólicos oferece proteção contra o desenvolvimento de diversas doenças como cancro, diabetes, osteoporose, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas (Arts & Hollman, 2005; Graf, Milbury & Blumberg, 2005). Os compostos fenólicos existentes tanto em alimentos como em plantas medicinais, como antioxidantes naturais que são, devido às suas propriedades terapêuticas, têm suscitado interesse na comunidade científica, tanto a nível alimentar como terapêutico.

1.2.1. Métodos de análise da atividade antioxidante

Durante as últimas décadas vários métodos analíticos têm vindo a ser desenvolvidos e otimizados para avaliar a capacidade antioxidante de extratos vegetais. No entanto, não existe um consenso por parte dos investigadores sobre qual o melhor método, embora seja consensual que a avaliação da capacidade antioxidante de uma amostra deverá envolver a utilização de diferentes métodos.

Os métodos padronizados devem obedecer a vários requisitos, nomeadamente: a utilização de uma fonte biologicamente relevante de radicais, serem simples, terem boa reprodutibilidade, serem ajustáveis a ensaios com antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos e ao uso de diferentes fontes de radicais (Prior, Wu & Schaich, 2005). Tendo em conta as reações químicas envolvidas os métodos para determinar a atividade antioxidante *in vitro* podem ser divididos em dois grupos: ensaios baseados na reação de transferência de eletrões (ET) e ensaios baseados na reação de transferência de átomos de hidrogénio (HAT). Os ensaios com base em ET detetam a capacidade que um antioxidante tem para transferir um eletrão para reduzir um oxidante e radicais que mudam de cor quando reduzidos. A extensão dessa mudança de cor está relacionada com a concentração de compostos antioxidantes na amostra (Wright et al., 2001). Já os ensaios que têm por base a reação HAT avaliam a capacidade de um antioxidante eliminar radicais livres cedendo átomos de hidrogénio (Prior et al., 2005). Para o estudo da atividade antioxidante dos diferentes extratos em estudo, os três métodos utilizados neste trabalho foram os seguintes: i) 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH); ii) *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (TEAC), iii) *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP).

O método do DPPH consiste na avaliação da capacidade de eliminação de um radical livre numa amostra, sendo um dos métodos mais utilizados para avaliação da atividade antioxidante de extratos vegetais. Este método foi inicialmente introduzido por Blois (1958) usando cisteína como antioxidante modelo, sendo a reação inicial a seguinte:



onde, o radical DPPH é representado por Z^{\bullet} e a molécula de cisteína por RSH. Este método apresentava algumas complicações e foi então introduzido um método modificado por Brand-Williams et al. (1995) que sugere uma simplificação do método de Blois (1958). Foi introduzido o termo de “IC₅₀” para a interpretação dos resultados do método, que é definido como a concentração de substrato que causa 50% de redução da cor do DPPH; quanto maior a atividade antioxidante menor o valor de IC₅₀ (Molyneux, 2004).

A molécula de DPPH é caracterizada como sendo um radical livre estável devido à deslocalização dos eletrões na molécula o que lhe confere uma coloração

violeta apresentando uma banda de absorção na região do visível a 520 nm (Molyneux, 2004). Quando a solução de DPPH é misturada com uma substância doadora de um átomo de hidrogénio (por exemplo compostos fenólicos), ocorre uma redução resultante na perda da cor violeta (Molyneux, 2004). O consumo de DPPH pode assim ser utilizado para estimar a capacidade antioxidante de uma amostra, uma vez que quanto maior o consumo de DPPH maior a capacidade antioxidante da amostra.

O método do DPPH tem como vantagem não ser afetado por reações laterais, como a inibição enzimática (Amarowicz, Pegg, Rahimi-Moghaddam, Barl & Weil, 2004). No entanto, o DPPH só se dissolve em meio orgânico (solventes alcoólicos) e os resultados podem ser afetados pela alteração do radical por ação da luz, do oxigénio e do tipo de solvente utilizado, existindo compostos vegetais que absorvem ao mesmo comprimento de onda (como os carotenoides) podendo interferir nos resultados (Karadag, Ozcelik & Saner, 2009).

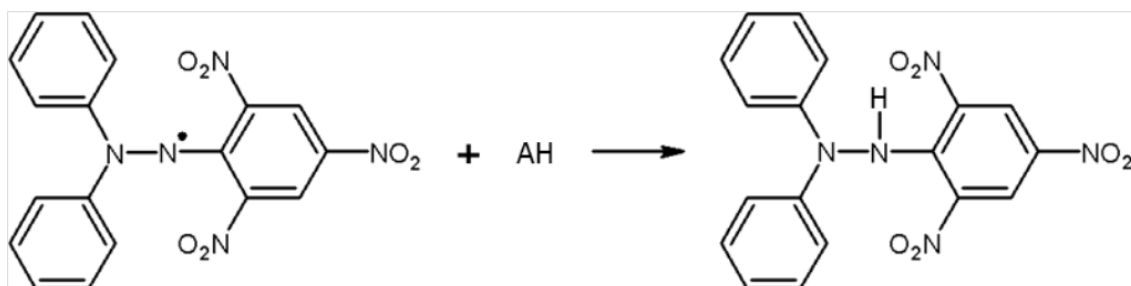


Figura 2. Representação da redução do DPPH (Molyneux, 2004).

O método TEAC avalia a capacidade da amostra de absorver o radical 2,2'-azino-bis-3- etilbenzolina-6-sulfónico (ABTS^{•+}). É um método rápido, de fácil execução e pode ser correlacionado com a atividade biológica, sendo um dos mais aplicados para realização de medidas da atividade de radicais livres de frutos, vegetais e seus produtos derivados (Berg, Haenen, Berg, Vijgh & Bast, 2000; Huang et al., 2005). Rice-Evans & Miller (1994) desenvolveram o método inicial que se baseava na formação do radical ABTS^{•+} através da interação do ABTS com o radical ferrilmioglobina, que era previamente gerado pela ativação da metmioglobina com o peróxido de hidrogénio. O método original revelou alguns problemas em relação a antioxidantes com reação rápida, uma vez que podia ocorrer redução do radical ferrilmioglobina. Para evitar este problema, Re et al. (1999) desenvolveram um método

em que pela adição de persulfato de potássio ao ABTS se produz o radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, incubando a mistura no escuro durante 12 a 16 h. A actividade antioxidante das amostras é quantificada pela capacidade de descoloração do radical catião $\text{ABTS}^{\bullet+}$ e os resultados são relacionados com a actividade do trolox (ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano) (padrão). Este método é especialmente interessante para os extractos vegetais, pois graças ao máximo de absorção a 734 nm, interferências inerentes à cor dos extractos são praticamente nulas.

A capacidade redutora dos compostos vegetais está directamente relacionada com a sua capacidade antioxidante. Este método baseia-se na capacidade que os antioxidantes possuem em reduzir o Fe^{3+} a Fe^{2+} numa reacção redox colorimétrica, que envolve a transferência de um electrão (Chung, Chang, Chao, Lin & Chou, 2002). Dependendo do poder redutor dos compostos avaliados, a cor amarela da solução altera para várias tonalidades de verde ou azul, podendo ser medida espectrofotometricamente a 700 nm (Yen & Chen, 1995). O pH diminui o potencial de ionização que impulsiona a transferência de eletrões e aumenta o potencial redox, causando uma mudança no mecanismo de reacção (Prior et al., 2005). Quando a espécie oxidante é o Fe_3^{+} ou o $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ (na composição do reagente ferricianeto), forma-se respetivamente Fe^{2+} ou $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ como produto da redução com o antioxidante, combinando-se com o outro componente do reagente para originar $\text{KFe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (azul da Prússia) como produto colorido. Ou seja, quando o Fe^{3+} é usado juntamente com o $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ como agente oxidante (no ensaio ferricianeto modificado), independentemente do par de reacções que ocorra, ambas originam o mesmo produto colorido (azul da Prússia) (Berker, Güçlü, Tor & Apak, 2007). No método, o aumento da absorvência indica o aumento da atividade antioxidante, ou seja, quanto mais azul estiver a mistura maior o poder redutor do extrato. O ensaio do poder redutor é considerado simples, rápido, económico e bastante fiável, podendo ser aplicado de forma manual, automatizada ou semi-automatizada (Prior et al., 2005). Neste trabalho utilizou-se o ácido ascórbico como controlo positivo e os resultados foram expressos em equivalentes de ácido ascórbico por grama de extrato.

1.3. Extração de compostos vegetais

A extração dos compostos bioativos das plantas pode ser efectuada mediante diferentes técnicas, nomeadamente, maceração, extração assistida por ultrassons (EAU) e extração Soxhlet, e utilizando solventes aquosos ou orgânicos como hexano, benzeno, clorofórmico, éter sulfúrico, metanol, e etanol (Pérez-Jiménez, Arranz, Tabernero, Diaz-Rubio, Serrano, Goñi & Saura-Calixto, 2008).

O processo de maceração consiste na colocação do material vegetal esmagado ou em pó num recipiente fechado onde é adicionado um solvente, e deixado à temperatura ambiente com agitação frequente. A mistura é em seguida filtrada (Handa, Khanuja, Longo & Rakesh, 2008)

A EAU é uma técnica recente, simples e barata que permite a recuperação de óleo e compostos bioativos de diferentes fontes. A intensidade da energia do ultrassom cria uma vibração extra nas moléculas de uma amostra o que facilita a recuperação dos compostos alvo do material sólido (amostra) para a fase líquida (solvente). Um alto rendimento num tempo curto de extração com uma baixa quantidade de solvente são vantagens notáveis desta técnica de extração. Além disso, é uma técnica que se ajusta tanto à utilização de solventes polares como de solventes não polares. Comparada ainda com outros métodos de extração convencionais, esta técnica permite o aumento do rendimento de extração juntamente com a manutenção dos compostos bioativos e de componentes sensíveis ao calor (Wang & Weller, 2006; Bimakr, Rahman, Taip, Adzahan, Sarker & Ganjloo, 2012; Samaram, Mirhosseini, Tan & Ghazali, 2013). É também de salientar, que a aplicação dos ultrassons a temperatura elevada e utilizando baixa quantidade de solvente revela bons resultados na recuperação de compostos bioativos com atividade antioxidante (Samaram, Mirhosseini, Tan, Ghazali, Bordbar & Serjouie 2015).

Após extração é essencial remover o solvente, por liofilização ou evaporação. O processo de evaporação é realizado num evaporador rotativo que permite separar solventes voláteis de produtos não-voláteis ou menos voláteis que são sólidos à temperatura ambiente. A evaporação é similiar a uma destilação, em que o solvente volátil é condensado numa parte do evaporador. O fato de o solvente não ser libertado para a atmosfera é um benefício de se utilizar o evaporador rotativo, uma vez que algumas das substâncias podem ser prejudiciais para o ambiente e para a saúde. Além

disso, o evaporador rotativo trabalhando com vácuo, que permite que o solvente entre em ebulição a baixa temperatura.

Quando os solventes têm um elevado ponto de ebulição, como a água (100°C), então a técnica que deve ser usada é a liofilização. A liofilização baseia-se na sublimação da água (passagem direta da água do estado sólido ao gasoso sem passar pelo estado líquido) de uma matriz congelada. Esta técnica é pouco agressiva para materiais sensíveis, permitindo conservar as suas propriedades biológicas e químicas. A liofilização é frequentemente usada na indústria farmacêutica, nomeadamente no fabrico de medicamentos e é utilizada na conservação de células e tecidos corporais, alimentos e microrganismos (Gerald, 2006; Ward, 2006). A liofilização tem como principais vantagens a remoção de água sem aquecimento da matriz, reduz a ocorrência de reações de oxidação e hidrólise, conduzindo a uma rápida reconstituição do material devido à elevada área de superfície e à manutenção da atividade, uma vez que não altera a constituição química inicial. No final do processo, obtém-se um extrato poroso, com cor e textura uniformes. É geralmente higroscópico, devendo ser guardado num recipiente selado ao abrigo da luz e a baixas temperaturas (Pinto, 2010).

Os teores em fenóis totais presentes nos extratos vegetais preparados neste trabalho por maceração e EAU foram determinados recorrendo ao método de Folin-Ciocalteu (F-C), através da oxidação destes via reagente Folin-Ciocalteu (Pérez-Jiménez et al., 2008). Os compostos fenólicos reagem com este reagente, formando um complexo azul que pode ser quantificado por espectrofotometria (Schofield, Mbugua & Pell, 2001). O método de F-C foi utilizado inicialmente para análise de proteínas, segundo o descrito por Folin & Ciocalteu (1927), e após sofrer algumas modificações (Singleton & Rossi, 1965) começou a ser utilizado para quantificar compostos fenólicos. Durante a transferência de eletrões de substâncias antioxidantes, o reagente F-C sofre uma redução, originando uma alteração de cor de amarelo para azul, permitindo assim quantificar os compostos fenólicos da amostra (Lowry, Rosenbrough, Farr & Randall, 1951).

O método colorimétrico do cloreto de alumínio (AlCl_3) foi também utilizado para quantificar o teor em flavonoides. O método baseia-se na capacidade do catião alumínio formar complexos estáveis com o hidroxilo dos flavonoides, formando um complexo de cor amarela (Almeida, Camarato, Navarro, Parker, Ikegaki & Junior, 1997; Funari & Ferro, 2006). O método espectrofotométrico baseado no AlCl_3 ainda é um

procedimento amplamente utilizado apesar das críticas justificadas (Bonvehí & Coll, 1994; Bonvehí, Coll & Jordá, 1994). O método revela valores de concentração de flavonoides mais baixo que o verdadeiro teor em flavonoides, é um método útil para análises rotineiras, uma vez que pode ser feito em laboratório sem instrumentação sofisticada (Woisky & Salantino, 1998).

1.4. *Chamaerops humilis* L.

C. humilis (figura 3), vulgarmente conhecida como palmeira-anã ou palmeira-das-vassouras, pertence à família *Arecaceae*. Esta planta tem caules grossos e fibrosos e altura inferior a 1 m (Pinto & Pernes, 2010). A palmeira-anã tem folhas em forma de leque, multi-fendidas, com pecíolo aculeado, as flores são amarelas e geralmente unissexuais, estão dispostas em espádices muito ramificadas protegidas por duas a quatro espatas castanho-avermelhadas. Os frutos são fibrosos-carnudos variando entre globosos a oblongos, de 1 a 4 cm, são amarelos ou castanhos na maturação (Afonso & McMurtrie, 1991; Pinto & Pernes, 2010).

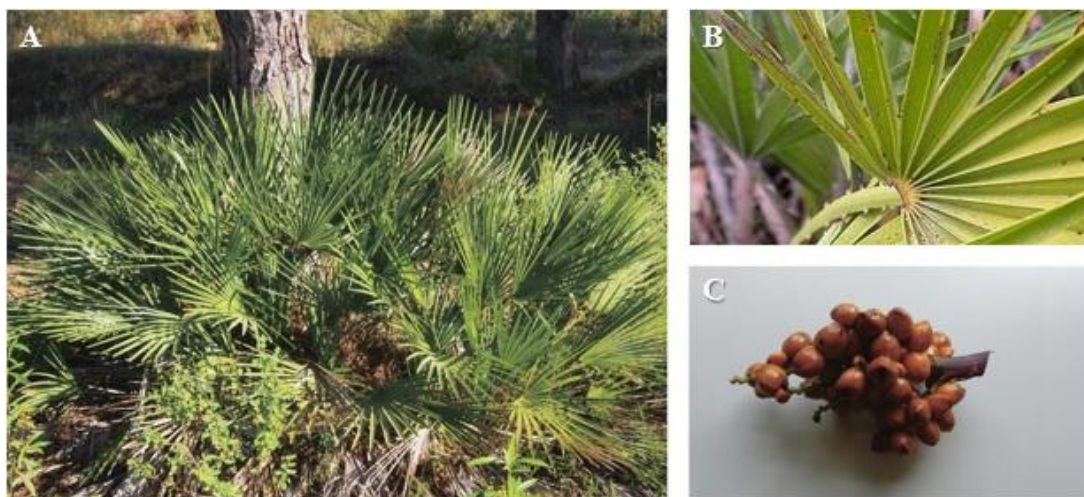


Figura 3. *Chamaerops humilis* L. A: aspeto geral da planta (Autor: Tomás Grevenstuck); B: pormenor da folha (Autor: Pedro Pinho; <http://www.flora-on.pt>) e C: frutos (Autor: Anabela Romano).

Esta palmeira é uma planta nativa da região mediterrânica (figura 4). Encontra-se em terrenos calcários de pouca altitude como no Barrocal Algarvio, muitas vezes constituindo aglomerados (Afonso & McMurtrie, 1991). Devido à sua rusticidade e

capacidade de recuperação após incêndio tem elevado valor ecológico na prevenção da erosão e desertificação. Além disso, é uma espécie amplamente cultivada em todo o mundo e usada como ornamental dada a facilidade com que se adapta a diferentes climas. É uma planta dióica, ocasionalmente hermafrodita, a sua propagação é feita a partir de sementes que germinam ao fim de 3 a 4 meses, no frio o crescimento é mais lento (Krempin, 1995; Merlo, Aleman, Cabello & Penas, 1993).

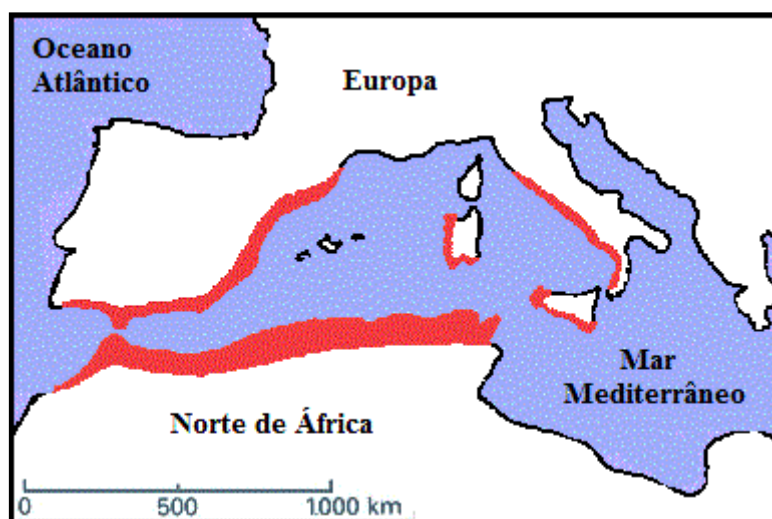


Figura 4 Distribuição geográfica de *C. humilis* representada a vermelho (Fonte: <http://www.plantapalm.com>).

As folhas desta planta, colhidas no verão e secas ao sol, são utilizadas para fazer cestos, assentos de cadeiras e vassouras (Pinto & Pernes, 2010). As fibras das folhas cardadas são utilizadas na indústria do papel (Pinto & Pernes, 2010). A nível alimentar, há referência à utilização dos frutos embora tenham um sabor áspero e adstringente. As folhas são tenras e as gemas terminais são utilizadas em saladas (Pinto & Pernes, 2010). É também usada como estimulante e afrodisíaco.

É referida como uma planta medicinal por vários autores (Allali, Benmehdi, Dib, Tabti, Ghalem & Benabadji, 2008; Beghalia, Ghalem, Allali, Belouatek & Marouf, 2008), sendo utilizada no tratamento da diarreia, provavelmente devido à sua riqueza em taninos. É utilizada na medicina tradicional marroquina no tratamento da diabetes, através de uma mistura aquosa feita a partir das suas folhas que possui efeitos hipoglicémicos (Kokwaro, 1976; Gaamoussi, Israili & Lyoussi, 2010; Hasnaoui, Benali, Bouazza & Benmehdi, 2013). A planta possui atividade anti-inflamatória, anabolizante e diurética (Bellakhdar, Claisse, Fleurentain & Younos, 1991; Beghalia et al., 2008;

Hasnaoui et al., 2013). Além disso, a atividade antioxidante de extratos foliares metanólicos e hidroalcólicos foi já reportada (Benahmed-Bouhafsoun, Djied, Mouzaz & Kaid-Harche, 2013; Miguel, Bouchmaaa, Aazza, Gaamoussi & Lyoussi, 2014). Num estudo recente que visou a análise química do óleo extraído da semente de uma variedade Tunisina de *C. humilis* detetou-se a presença de compostos benéficos para a saúde como ácidos gordos e tocotrienóis (Nehdi et al., 2014). Este óleo revelou ainda elevada estabilidade térmica o que reforça as suas potencialidades para a indústria alimentar e farmacologia.

A informação relativa aos constituintes químicos de *C. humilis* é rara, e os trabalhos existentes muito preliminares. Nesses estudos verificou-se a presença de alguns grupos de compostos, nomeadamente taninos, saponinas, flavonoides, terpenóides, esteróides, óleos voláteis e açúcares redutores nos extratos aquoso, de éter dietílico e metanol de folha e fruto (Benmehdi, Hasnaoui, Benali & Salhi, 2012; Hasnaoui et al., 2013).

1.5. Objetivos

Os estudos fitoquímicos e de bioatividade em extratos de *C. humilis* são muito reduzidos e limitam-se essencialmente a extratos foliares. O trabalho existente com a espécie é, contudo suficiente para demonstrar a suas potencialidades e justificar a realização de estudos mais aprofundados para avaliar o interesse da espécie como fonte de compostos bioativos. Assim, os objetivos específicos deste trabalho foram:

- 1) determinar a capacidade antioxidante de extratos de diferentes tipos de material vegetal (folhas, sementes, e polpa e pele dos frutos) através dos métodos DPPH, ABTS e FRAP.
- 2) estudar a capacidade dos extratos para inibir a atividade dos enzimas AChE, BChE e TYR;
- 3) avaliar o teor em compostos fenólicos e flavonoides totais;
- 4) avaliar o efeito de diferentes condições de extração no teor em fenóis e capacidade antioxidante de extratos de semente;
- 5) efetuar um estudo preliminar do perfil fenólico dos extratos por cromatografia líquida de alta performance com detecção por arranjo de díodos (HPLC-DAD).

2. Materiais e Métodos

2.1. Material Vegetal

Foram recolhidos frutos maduros e folhas de *C. humilis* de plantas silvestres a crescer no Pontal (Faro, Portugal) durante o mês de setembro de 2014. Os frutos maduros foram separados em pele, polpa e semente. O material vegetal (folhas, pele, polpa e sementes) foi seco em estufa (Binder BD 115, Tuttlingen, Germany) a 40 °C durante 48 h e moído (< 2 mm).

2.2. Preparação dos extratos vegetais

Num primeiro ensaio foram preparados extratos metanólicos por maceração a partir de sementes, pele, polpa e folhas. Para tal, e com o intuito de efetuar uma extração exaustiva, misturaram-se 10 g de material vegetal com 100 ml de metanol (MeOH) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) e manteve-se a mistura sob agitação (150 rpm) durante 24 h à temperatura ambiente. Após este período removeu-se o solvente por decantação e repetiu-se o procedimento com solvente novo. Num outro ensaio, prepararam-se extratos vegetais também por maceração mas apenas a partir de sementes. Para tal, 2,5 g de material vegetal foram extraídos com 50 ml de MeOH a 0, 50 e 100% durante 20 e 60 min. Finalmente, foi também, aplicada a EAU, tendo sido testada a concentração de MeOH (0, 50 e 100%), o tempo (20, 40 e 60 min) e a temperatura (30 e 50°C) de extração. Para tal, utilizou-se um banho ultrassom Elmasonic S 100 (H) (37 kHz) (Elma Hans Schmidbauer GmbH & Co. KG, Singen, Germany). Neste ensaio utilizaram-se igualmente 2,5 g de material vegetal de semente e 50 ml de solvente de extração. Todos os extratos foram filtrados, o solvente foi removido por evaporação ou liofilização (no caso dos aquosos) e o resíduo seco armazenado a -20 °C até posterior utilização.

2.3. Atividade antioxidante

2.3.1. Método do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)

Para avaliar a capacidade antioxidante dos extratos utilizou-se o método descrito por Soler-Rivas, Espin & Wichers (2000) com algumas modificações. Preparou-se uma solução de trabalho de DPPH a 90 µM em MeOH a 80%. Em todos os ensaios foram

utilizados 30 µl de extrato vegetal a diferentes concentrações, 300 µl de solução de trabalho de DPPH diluídos em 570 µl de MeOH a 80%. Foi efetuado um controlo sem extrato vegetal, com o correspondente volume em MeOH a 80% e o BHT foi usado como controlo positivo. A mistura foi incubada durante 30 min ao abrigo da luz e após esse tempo foi lida a absorvência a 515 nm (PG Instruments T70+, Leicestershire, United Kingdom).

Calculou-se a percentagem de inibição do radical livre DPPH para cada concentração de extrato, tendo em conta a absorvência do controlo sem extrato, para tal utilizou-se a seguinte equação 1:

$$I\% = \left(1 - \frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controlo}}}\right) \times 100$$

Onde A_{amostra} é a absorvência das amostras e A_{Control} é a absorvência do controlo. Os resultados foram apresentados como valores de IC_{50} (µg/ml).

2.3.2. Método Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)

O método TEAC utiliza o catião radical $ABTS^{\bullet+}$ que é originado através da reação de uma pastilha de ABTS (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) com persulfato de potássio a 7 mM (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). A mistura reacional foi incubada no escuro à temperatura ambiente entre 12 a 16 h. Antes de se utilizar a solução do $ABTS^{\bullet+}$ a mistura foi diluída de forma a obter uma absorvência de $0,700 \pm 0,020$ a 734 nm e foi utilizado o trolox (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) como padrão (0,5-0,1 mM). Para efetuar a análise adicionaram-se numa microplaca de 96 poços 10 µl de diluição dos extratos, do padrão ou de tampão fosfato, e 190 µl da solução de $ABTS^{\bullet+}$ já diluída. A absorvência foi lida a 734 nm no leitor de microplacas Tecan Infinite M200 (Männedorf, Switzerland).

A capacidade antioxidante das amostras é dada pela equação 1 e os resultados são expressos em micromole de equivalentes de trolox (ET) por grama de extrato ($\mu\text{mol}_{\text{ET}}/\text{g}_{\text{extrato}}$) que são intrapolados com a reta de regressão linear determinada com as concentrações de trolox e as inibições.

2.3.3. Avaliação da capacidade para reduzir o ferro (FRAP)

O poder redutor dos extratos vegetais foi determinado de acordo com o método descrito por Yen & Chen (1995) com algumas modificações. Foi utilizado tampão fosfato de sódio (200 mM; pH 6,6), ferricianeto de potássio [$K_3Fe(CN)_6$] a 1% (Panreac, Spain), ácido tricloacético a 10% (TCA) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) e cloreto de ferro a 0,1% ($FeCl_3$) (VWR, Leuven, Belgium), e ácido ascórbico (Merck, Germany) (0,5–0,0625 mM) como padrão. Foram misturados 100 µl de extrato vegetal, do padrão ou do controlo (tampão) com 250 µl de tampão fosfato e 250 µl de ferricianeto de potássio e incubou-se a mistura a 50 °C durante 20 min. Após o período de incubação adicionaram-se 250 µl de TCA e centrifugou-se a mistura a 3000 rpm durante 10 min. Posteriormente, e numa microplaca, misturaram-se 100 µl do sobrenadante resultante da centrifugação com 100 µl de água destilada e 20 µl de $FeCl_3$. Mediu-se a absorvência a 700 nm, o aumento das absorvências da mistura indica um aumento do poder redutor. Os resultados foram expressos em micromoles de equivalentes de ácido ascórbico por grama de extrato ($\mu mol_{EAA}/g_{extrato}$).

2.4. Teor em fenóis totais – método F-C

Para determinar o teor em fenóis totais utilizou-se o método F-C que se baseia na oxidação de compostos fenólicos na presença do reagente F-C, dando origem a uma solução de cor azul. Nesta técnica, em que se prepararam todos os reagentes em tampão fosfato (75 mM; pH 7,0), misturaram-se 200 µl de reagente F-C a 10% (v/v) (Panreac, Spain), 100 µl das diluições dos extratos, do padrão ou de tampão fosfato, e 800 µl de carbonato de sódio (Na_2CO_3) (VWR, Leuven, Belgium). A mistura incubou-se durante 2 h à temperatura ambiente para posterior leitura da absorvência a 765 nm. O padrão utilizado foi o ácido gálgico (Fluka, Spain) (0,5-0,004 mM) e o teor de fenóis total foi expresso como micromole de equivalentes ao ácido gálgico por grama de extrato vegetal ($\mu mol_{EAG}/g_{extrato}$).

2.5. Teor em flavonoides totais – método do $AlCl_3$

Para quantificar o teor total em flavonoides utilizou-se o método colorimétrico do $AlCl_3$ em que se forma um complexo entre o alumínio e o hidroxilo de cor amarela.

Prepararam-se os seguintes reagentes: solução de AlCl_3 a 1% (v/v), em etanol a 80%, e solução de acetato de sódio a 1 M. Neste método 500 μl de extrato vegetal a diferentes concentrações, etanol a 80% (branco) ou padrão foram diluídos em 1,5 ml de etanol a 80%. De seguida adicionaram-se 100 μl de AlCl_3 (1%) (Fluka, Spain) e de acetato de sódio (1 M). A mistura foi incubada durante 30 min à temperatura ambiente e posteriormente leu-se a absorvência a 415 nm. O padrão utilizado foi a quercetina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) e utilizaram-se várias diluições da mesma (0,25-0,031 mM). O teor em flavonoides totais foi expresso como micromole de equivalentes de quercetina por grama de extrato vegetal ($\mu\text{mol}_{\text{EQ}}/\text{g}_{\text{extrato}}$).

2.6. Atividade inibitória da acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE)

Para a determinação da atividade inibitória da AChE e BChE foi utilizado o método espectrofotométrico descrito por Ellman et al. (1961), com ligeiras modificações. Este método baseia-se na hidrólise da ACh pelos enzimas produzindo tiocolina. A atividade é medida pelo aumento da cor amarela da tiocolina quando reage com o ácido 5-5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) (DTNB), sendo essa atividade medida espectrofotometricamente a 405 nm. Os diferentes extratos vegetais foram ressuspendidos em tampão fosfato de sódio (100 mM; pH 8,0). Os enzimas AChE (0,28 U/ml) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) e BChE (0,28 U/ml) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) formaram um complexo enzima-substrato com os substratos iodeto de acetilcolina (ATCi) (15 mM) (Fluka, Spain) e iodeto de butirilcolina (BTCi) (15 mM) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), respetivamente.

O ensaio da atividade inibitória foi realizado em microplacas transparentes de 96 poços, onde se adicionou em cada poço 125 μl de DTNB (3 mM) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), 25 μl do substrato ATCi ou BTCi, 50 μl de tampão fosfato de sódio, 25 μl de diluição dos extratos, de galantamina (controlo positivo) ou de tampão fosfato de sódio (branco) e finalmente 25 μl de enzima AChE ou BChE. A leitura foi feita durante 5 min. A atividade colinesterásica foi determinada tendo em conta o declive da reta e a percentagem de inibição foi calculada comparativamente ao controlo sem inibidor (branco). Os resultados foram apresentados sob a forma de valores de IC_{50} .

2.7. Ensaio da atividade inibitória da tirosinase (TYR)

Para determinar a atividade inibitória do enzima TYR foi utilizado o método descrito por Masuda et al. (2005), com algumas alterações. Os extratos vegetais foram preparados previamente a diferentes concentrações em tampão fosfato de sódio (20 mM; pH 6,8). À semelhança do ensaio da atividade inibitória das ChEs este ensaio foi também realizado em microplacas transparentes de 96 poços, onde se adicionou em cada poço 80 µl de tampão fosfato de sódio, 40 µl de enzima TYR (46 U/ml, em tampão fosfato de sódio) e 40 µl de diluição dos extratos, ácido kójico (controlo positivo) ou de tampão fosfato de sódio (branco). Foram também realizados brancos sem enzima. A mistura foi incubada à temperatura ambiente durante 10 min e posteriormente adicionaram-se 40 µl de L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina) (2,5 mM) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) a todos os poços, incubou-se novamente durante 10 min e em seguida fez-se a leitura a 475 nm. As percentagens de inibição foram calculadas comparativamente ao controlo sem inibidor e os resultados foram expressos como valores de IC₅₀ (µg/ml).

2.8. Cromatografia Líquida de Alta Performance com Detecção por Arranjo de Díodos (HPLC-DAD)

Nos extratos de folhas, polpa e sementes de *C.humilis* preparados no primeiro ensaio foi feita uma primeira abordagem do estudo dos seus constituintes fenólicos por HPLC-DAD. Para tal os extratos foram previamente filtrados por uma membrana de politetrafluoretileno (PTFE) e poro 0,45 µm (Fiorini, Ingré, França). Analisou-se 20 µl de cada extrato em unidade analítica de HPLC (Gilson), através de uma coluna Spherisorb ODS2 (25.0×0.46 cm; 5 µm tamanho de partícula; Waters, Milford, MA).

O sistema de eluentes usado consistiu em água:ácido fórmico (19:1) (A) e MeOH (B), e foi estabelecido o seguinte gradiente: 5% de B aos 0 min, 15% de B aos 3 min, 25% de B aos 13 min, 30% de B aos 25 min, 35% de B aos 35 min, 45% de B aos 39 min, 45% de B aos 42 min, 55% de B aos 47 min, 75% de B aos 56 min, 100% de B aos 60 min, 100% de B aos 65 min e 5% de B aos 66 min, até aos 80 min, mantendo um caudal de eluentes de 0,9 ml/min. A deteção foi efetuada com um detetor de díodos Gilson. Os espetros foram acumulados no intervalo 200-400 nm e os cromatogramas

foram registados a 280, 320 e 350 nm. Os dados foram processados no software Unipoint System (Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel, France).

Os compostos fenólicos foram quantificados medindo as suas absorvências nos cromatogramas obtidos a 280 nm (ácido hidroxibenzoicos e catequinas), 320 (ácidos hidroxicinamicos) e a 350 nm (flavonoides) e pelo método do padrão externo, segundo a equação 2, o procedimento foi realizado em triplicado.

$$C(c) = \left[\frac{A(c)}{A(p)} \right] \times C(p)$$

Onde C(c) é a concentração do composto na amostra, A(c) é a área do composto na amostra, A(p) é a área padrão e a C(p) é a concentração padrão.

2.9. Análise estatística e tratamento de dados

Em todos os ensaios as medições foram feitas em triplicado e repetidas três vezes. Os resultados foram apresentados sob a forma de média \pm erro padrão, exceto na análise por HPLC-DAD em que foi média \pm desvio padrão.

Os dados foram tratados estatisticamente usando o programa SPSS para Windows, através de análise de variância (ANOVA). As diferenças significativas entre médias foram identificadas recorrendo ao teste de Duncan ou ao *T*-Test e para as correlações foi usado o teste de Pearson.

3. Resultados e Discussão

3.1. Avaliação da atividade biológica e teor em fenóis de diferentes extratos de *C. humilis*

Com o objetivo de obter informação sobre o potencial biológico da espécie *C. humilis* foi avaliada a capacidade antioxidante, anti-AChE, anti-BChE e anti-TYR de extratos de diferentes tipos de material vegetal, nomeadamente folha, pele, polpa e semente. Para além disso foram quantificados os teores em fenóis e flavonoides totais nestes extratos e foi feita uma análise preliminar dos extratos por HPLC-DAD. Os extratos foram obtidos por maceração e utilizou-se o MeOH como solvente de extração. Os rendimentos de extração variaram muito dependendo do tipo de material vegetal, sendo que o maior rendimento foi obtido para a polpa e o menor para sementes, provavelmente devido à disponibilidade dos diferentes componentes extratáveis em cada parte da planta.

3.1.1. Avaliação da capacidade antioxidante

Os antioxidantes são moléculas que podem interagir com radicais livres e terminar a sua reação em cadeia antes que moléculas que são vitais sejam danificadas. Os antioxidantes têm um papel importante na proteção do organismo humano contra infeções e doenças neurodegenerativas (Sadeghi, Kuhestani, Abdollahi & Mahmood, 2014), como tal várias investigações têm vindo a ser feitas para identificar antioxidantes naturais para a prevenção destas doenças. O potencial antioxidante de extratos de diversas espécies de palmeiras, nomeadamente do fruto, tem sido reportado por alguns autores, os frutos possuem uma variedade de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos com propriedades anti-mutagénicas e anti-cancerígenas em diferentes quantidades dependendo da espécie (Abbas, Foroogh, Liong & Azhar, 2008; Biglari, AlKarkhi & Easa, 2008; Shams, Khanavi, Hajimahmoodi, Jahangiri & Hadjiakhoondi, 2010).

Neste trabalho, a atividade antioxidante de diversos extratos de *C. humilis* foi determinada através de três métodos, DPPH, TEAC e FRAP. No método DPPH, a medida é dada pelo decréscimo da absorvência a 515 nm através da captura do radical livre pelos compostos antioxidantes presentes na amostra. O método TEAC mede a

capacidade antioxidante determinada pela descoloração do ABTS através da medida de redução do radical com a inibição percentual de absorvência a 734 nm. A capacidade de redução de um composto pode servir como indicador do seu potencial antioxidante. A presença de redutores, tais como antioxidantes leva à ocorrência da redução do complexo Fe^{3+} /ferricianeto à forma ferrosa. Assim, o Fe^{2+} pode ser monitorizado através da medição da formação do azul Prússia a 700 nm (Chung et al., 2002). A partir da figura 5 é possível verificar o elevado potencial antioxidante dos diferentes extratos estudados.

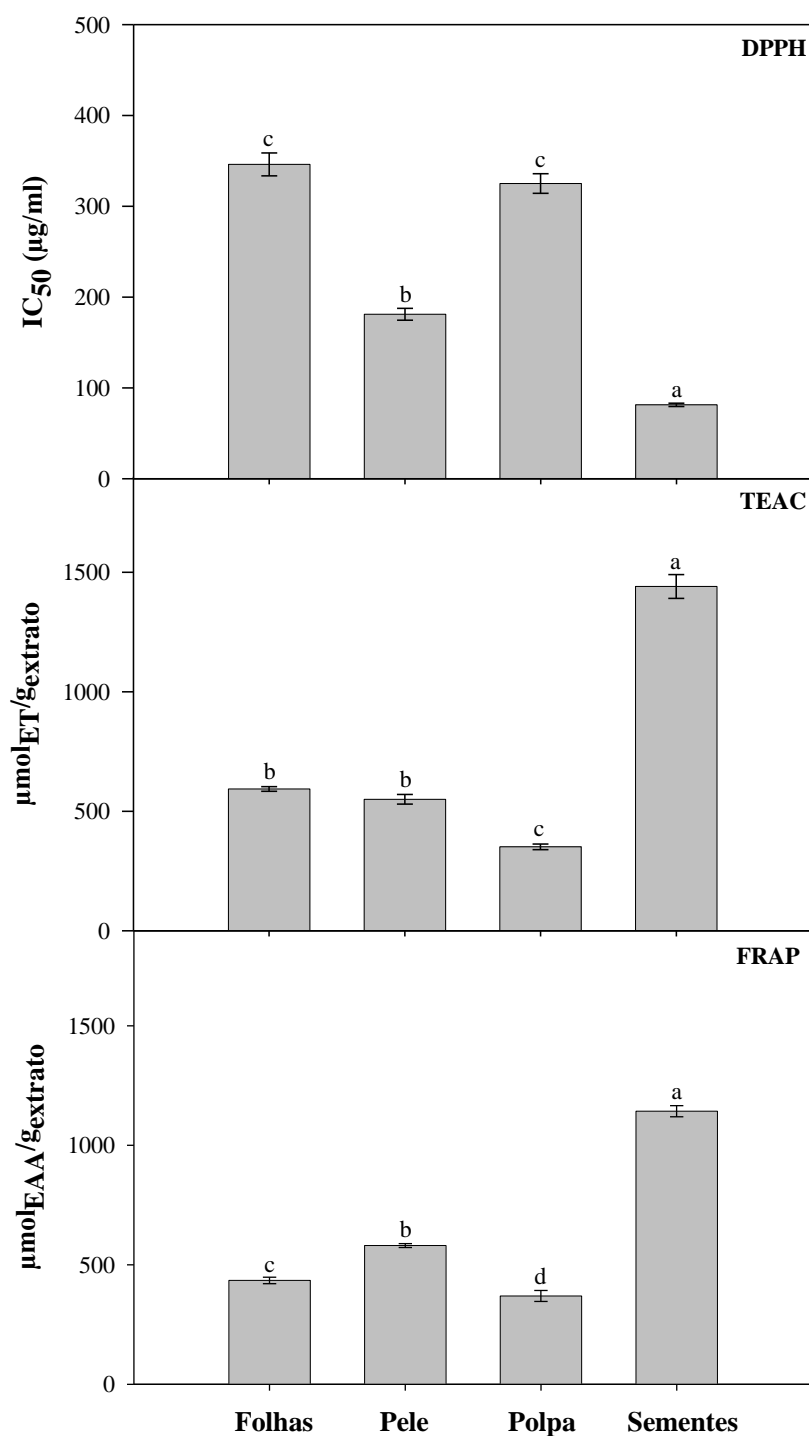


Figura 5. Avaliação da atividade antioxidante dos diferentes extratos de *Chamaerops humilis* através dos métodos DPPH, TEAC e FRAP. Os valores representam a média \pm o erro padrão de três repetições. No mesmo gráfico, valores seguidos de letras diferentes representam médias significativamente diferentes de acordo com o teste de Duncan ($P < 0,05$). Controle positivo no ensaio DPPH (BHT): $IC_{50} = 462.24 \pm 0.03$ µg/ml.

No caso do DPPH, os resultados encontram-se expressos como valores de IC_{50} , e variaram de $81,28 \pm 1,79$ a $346,08 \pm 12,63$ $\mu\text{g/ml}$. Tendo em conta que quanto mais baixo os valores obtidos mais eficiente foi a capacidade do extrato inibir o radical, verifica-se que o extrato de sementes foi aquele com melhor resultado, embora as folhas, e os restantes constituintes do fruto também apresentassem bons resultados.

Analisando os resultados obtidos pelo método TEAC observa-se que todos os extratos revelaram capacidade antioxidante ao inibir o radical $ABTS^{\bullet+}$. Os valores estão expressos em equivalentes de trolox, o que significa que são necessárias micromoles de trolox para traduzir a mesma atividade antioxidante de um grama de extrato (Ou, Hampsch-Woodill & Prior, 2001). Os resultados variaram entre $351,06 \pm 11,99$ e $1440,42 \pm 49,88$ $\mu\text{mol}_{ET}/\text{g}_{extrato}$, e mais uma vez, o extrato das sementes possui uma maior capacidade de neutralizar o $ABTS^{\bullet+}$ com um valor significativamente mais elevado que os restantes extratos ($P < 0,05$), $1440,42 \pm 49,88$ $\mu\text{mol}_{ET}/\text{g}_{extrato}$.

Relativamente ao poder redutor do ferro verifica-se através da análise da figura 5 que todos os extratos apresentaram uma elevada capacidade para reduzir o ferro com uma gama de valores entre $369,56 \pm 22,91$ e $1142,46 \pm 23,24$ $\mu\text{mol}_{EAA}/\text{g}_{extrato}$. O extrato de sementes voltou a ser aquele com o valor significativamente mais elevado ($P < 0,05$) ($1142,46 \pm 23,24$ $\mu\text{mol}_{EAA}/\text{g}_{extrato}$).

O extrato das sementes apresentou atividade antioxidante mais elevada em qualquer um dos métodos usados. Estudos anteriores demonstraram o potencial antioxidante de frutos de várias palmeiras (Biglari et al., 2008; Khanavi et al., 2009; Shams et al., 2010; Sadeghi, Valizadeh & Shermeh, 2015). Shams et al. (2010) revelou ainda que a atividade antioxidante do fruto da palmeira *Phoenix dactylifera* L. pode ser utilizado como antioxidante natural na indústria alimentar e farmacêutica. Em relação ao fruto de *C. humilis* ainda não foram realizados quaisquer estudos sobre o seu potencial antioxidante, existindo apenas estudos que demonstram o potencial antioxidante de extratos de folhas. Benahmed-Bouhafoun et al. (2013) e Miguel et al. (2014) obtiveram valores de IC_{50} pelo método DPPH de $180,71$ $\mu\text{g/ml}$ e 35 $\mu\text{g/ml}$, respetivamente, valores estes inferiores aos obtidos neste trabalho ($346,08$ $\mu\text{g/ml}$). Estas variações podem ser atribuídas às características ambientais e fitoquímicas da planta em estudo, uma vez que o material vegetal deste trabalho foi recolhido em sítios diferentes e em épocas diferentes do que foi utilizado nos outros trabalhos; e às diferentes condições utilizadas na extração e avaliação da atividade antioxidante.

Os diferentes extratos de *C. humilis* revelaram um elevado potencial antioxidante, destacando-se o extrato das sementes que revelou ser um bom doador de hidrogénio podendo acabar com uma reação radical em cadeia, de forma a converter os radicais livres em produtos estáveis. A capacidade de doar hidrogénio é uma característica de antioxidantes primários, que doando o seu hidrogénio a um radical livre inibem a fase de propagação da oxidação lipídica (Ordoñez, Gomez, Vattuone & Isla, 2006), reduzindo a produção de radicais livres e, em última análise, contribuindo para diminuir muitas das doenças humanas, como doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e cancro. A capacidade redutora de um extrato pode relevar o seu potencial antioxidante, uma vez que compostos com poder redutor indicam que são dadores de eletrões e podem reduzir intermediários dos processos da peroxidação lipídica, uma vez que conseguem atuar como antioxidantes primários e secundários (Yen & Chen, 1995).

3.1.2. Inibição *in vitro* dos enzimas AChE, BChE e TYR

A DA raramente ocorre em idades inferiores a 50 anos e geralmente denotam-se perdas cognitivas consideráveis nos doentes afetados. A maioria dos casos da doença são esporádicos sendo que 5-10% são de origem familiar (Mancuso, Bates, Butterfi, Calafato, Cornelius, Lorenzo et al., 2007). Clinicamente a DA é caracterizada pela perda progressiva de memória, um declínio na capacidade de linguagem e demência, resultado da imensa perda de neurónios do cérebro associados ao sistema cognitivo (Benzi & Moretti, 1998; Clark, 2000). Em termos bioquímicos, a DA é descrita pela redução dos níveis do neurotransmissor ACh, que é hidrolisado primariamente pela AChE e secundariamente pela BChE (Racchi, Mazzucchelli, Porrello, Lanni & Govoni, 2004). A inibição das ChEs é uma abordagem estabelecida para atenuar os sintomas relacionados com a DA (Orhan, Kartal, Naz, Ejaz, Yilmaz, Kan et al., 2007).

A DP é uma doença neurodegenerativa comum em adultos e idosos e é a segunda doença neurodegenerativa mais comum depois da DA afetando 6 milhões de pessoas no mundo. É uma doença caracterizada pela presença de rigidez, tremor e instabilidade postural. A perda de neurónios de dopamina na *substantia nigra* é a característica patológica da DP (Pakkenberg, Moller, Gundersen, Dam & Pakkenberg, 1991; Lesage & Brice 2009). A presença do promotor da TYR e a sua atividade no sistema nervoso central, em particular na *substantia nigra* (Tief, Schmidt & Beermann,

1998; Greggio et al., 2005), favorece a formação de doenças neurodegenerativas como DP. Os compostos vegetais podem fornecer neuroproteção através da sua capacidade para inibir este enzima impedindo a formação de neurotoxinas no cérebro (Vauzour, Vafeiadou & Spencer, 2007).

Na tentativa de encontrar inibidores de origem vegetal dos enzimas envolvidas no tratamento da DA e DP, neste trabalho, avaliou-se a capacidade dos extratos de folhas, pele, polpa e sementes de *C. humilis* para inibir a atividade de AChE, BChE e TYR. Os resultados estão representados na figura 6.

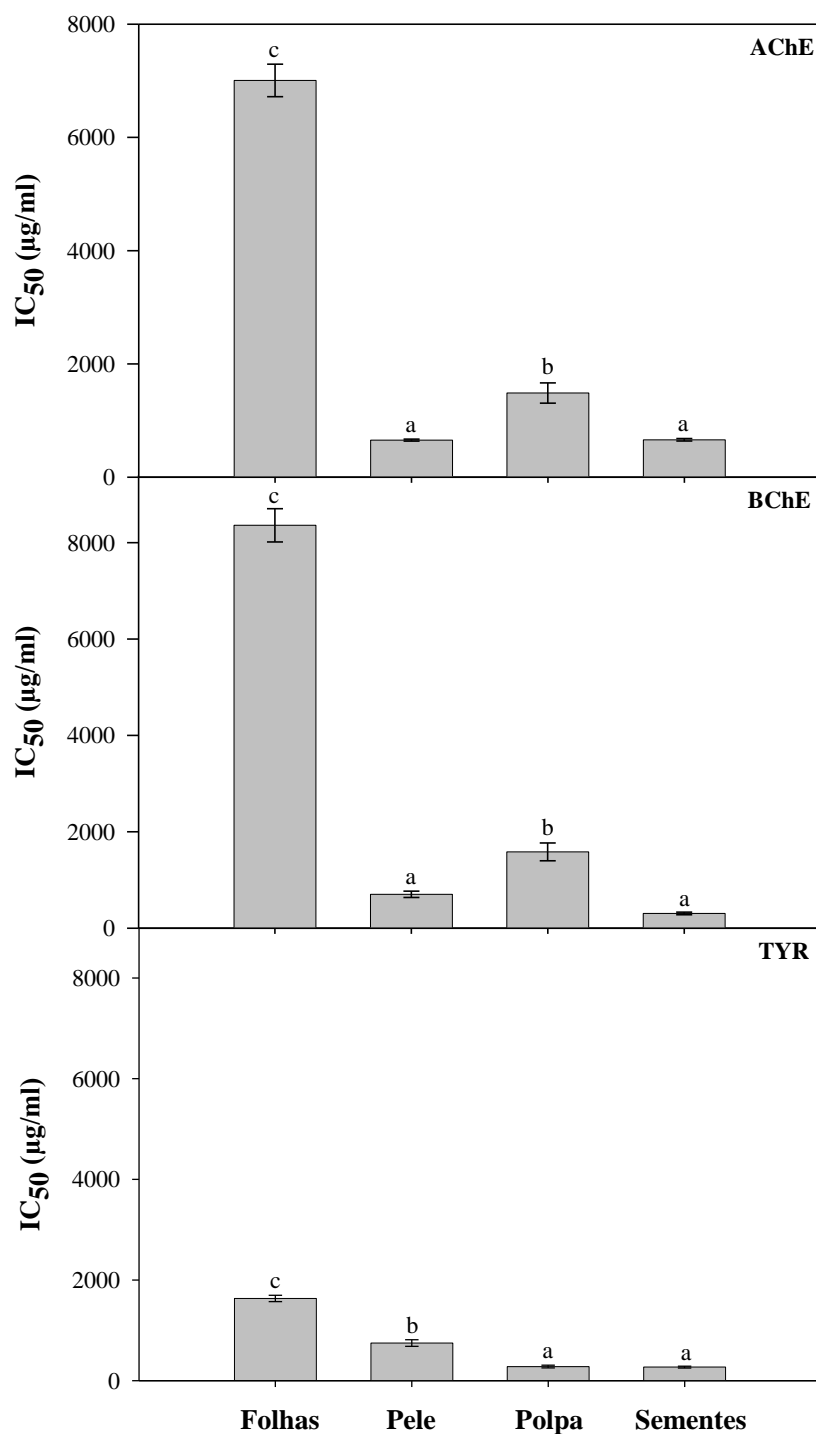


Figura 6. Inibição da atividade das enzimas AChE, BChE e TYR *in vitro* pelos diferentes extratos de *Chamaerops humilis*. Os valores representam a média \pm o erro padrão de três repetições. No mesmo gráfico, valores seguidos de letras diferentes representam médias significativamente diferentes de acordo com o teste de Duncan ($P < 0,05$). Controle positivo nos ensaios anti-ChEs (galantamina): $IC_{50} = 2.20 \pm 0.04$ e 11.72 ± 1.09 µg/ml para a AChE e BChE, respectivamente; controle positivo no ensaio anti-TYR (ácido kójico): $94,46 \pm 1,20$ % de inibição a 200 µg/ml.

Verifica-se que todos os extratos inibem os enzimas AChE e BChE, sendo os extratos de frutos os que revelaram uma maior capacidade inibitória ($P < 0,05$). A melhor inibição tanto de AChE como de BChE foi exibida pelos extratos de sementes (IC_{50} de $660,16 \pm 21,94$ e $304,86 \pm 26,41$ $\mu\text{g/ml}$ para a AChE e BChE, respetivamente) e pele ($653,68 \pm 18,20$ e $701,54 \pm 65,84$ $\mu\text{g/ml}$, respetivamente). O extrato de folhas inibiu a atividade enzimática, mas a concentrações mais elevadas ($7005,82 \pm 287,85$ e $8358,87 \pm 343,57$ $\mu\text{g/ml}$, respetivamente).

A diferença observada entre a atividade inibitória dos extratos de frutos e de folhas face aos enzimas AChE e BChE poderá dever-se à diferença de compostos bioativos presentes em cada extrato, facto comprovado por Mata et al. (2007) e Fawole, et al. (2010) nos seus estudos sobre o papel dos compostos de outras espécies na inibição da atividade anticolinesterásica. Alguns estudos comprovam que extratos de frutos, e mais fortemente o extrato de sementes de algumas espécies como *Hypericum amblysepalum* Hochst. (Keskin, 2015), *Prunus mahaleb* L. (Oskoueian, Haghighi, Ebrahimi & Oskoueian, 2012), *Streblus asper* Lour., *Piper nigrum* L. (pimenta preta) e *Musa sapientum* L. (banana) (Ingkaninan, Temkitthawon, Chuenchom, Yuyaem & Thongnoi, 2003), revelaram elevada capacidade de inibir ChEs (Wetwitayaklung, Limmatvapirat & Phaechamud, 2013; Oboh, Akinyemi, Omojokun & Oyeleye, 2014). Neste trabalho a capacidade inibitória dos enzimas AChE e BChE de extratos de frutos (pele, polpa e semente) de *C. humilis* é descrita pela primeira vez. Em relação ao extrato foliar Miguel et al. (2014) não detetaram atividade inibitória do enzima AChE nas condições estudadas.

Verifica-se que a atividade da enzima TYR foi inibida pelos extratos de *C. humilis* sendo a ação inibitória mais forte quando comparada com a dos enzimas AChE e BChE (figura 6). Novamente os componentes dos frutos revelaram o maior potencial inibitório, com resultados de $268,97 \pm 17,75$, $279,99 \pm 26,87$ e $747,46 \pm 66,23$ $\mu\text{g/ml}$ para as sementes, polpa e pele, respetivamente. O extrato foliar também revelou uma boa capacidade inibitória em relação a este enzima, $1633,32 \pm 62,33$ $\mu\text{g/ml}$.

A TYR está ligada à DP e outras doenças neurodegenerativas, oxidando o excesso de dopamina para produzir dopamina quinonas, espécies altamente reativas que induzem dano neuronal e morte celular (Asanuma, Miyazaki & Ogawa, 2003), assim sendo o extrato de sementes volta a ter um papel fulcral como inibidor desta vez face à

oxidação do L-DOPA. Estudos anteriores com extratos de outras plantas já revelaram a capacidade de inibir a TYR, no entanto os valores obtidos neste estudo foram superiores aos reportados num estudo com extratos de romã (Yoshimura, Watanabe, Kasai, Yamakoshi & Koga, 2005). O extrato metanólico do fruto de *Citrus grandis* também demonstrou capacidade de inibir esta enzima mas utilizando a concentração de extrato de 10 mg/ml (Wu, Chiang, Tzeng & Shyu, 2010). Os extratos de *S. albida* subsp. *colchica* e *S. brevibracteata* subsp. *subvelutina* apresentaram inibição da TYR numa percentagem de 39,57% e 51,58%, respetivamente, mas a uma concentração de 1 mg/ml (Loizzo, Tundis & Menichini, 2012). Com base em pesquisas em várias bases de dados (*Web of Science* e *NCBI*), verifica-se que não há estudos deste género com extratos de *C. humilis*, sendo este estudo pioneiro na avaliação do potencial terapêutico desta espécie.

3.1.3. Quantificação do teor total em fenóis e em flavonoides

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários das plantas que têm vindo a mostrar benefícios para a saúde nomeadamente devido às suas propriedades antioxidantes e podem, por isso, ser úteis para utilização em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (Bagchi, Bagchi, Stohs, Das, Ray, Kuszynski et al., 2000; Ariga, 2004, Piantino & Aquino, 2008, Cicerale, Lucas & Keast, 2010).

Os flavonoides fazem parte da maior classe de compostos fenólicos e diversos estudos apontam para que a atividade antioxidante dos mesmos se deve à sua estrutura química. A quercetina é o flavonoide com os melhores requisitos a nível estrutural tendo assim uma boa ação antioxidante (Valentão, 2002; Cunha, 2005; Seabra et al., 2006). Para além das propriedades antioxidantes, também possuem propriedades anti-proliferativas, anti-histamínicas e anti-inflamatórias (Boots, Haenen & Bast, 2008).

Uma vez que os compostos fenólicos e mais concretamente os flavonoides estão associados ao potencial antioxidante dos extratos vegetais, neste trabalho foram quantificados utilizando os métodos colorimétricos F-C e do $AlCl_3$, respetivamente. Os resultados encontram-se apresentados na figura 7.

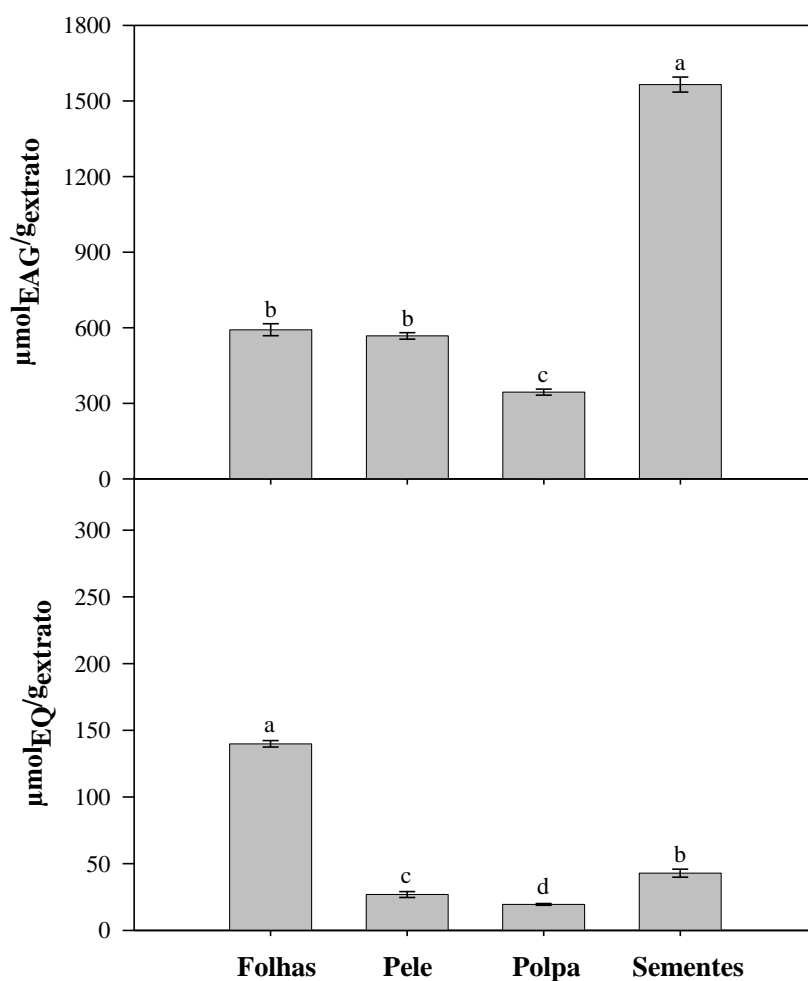


Figura 7. Quantificação do teor em fenóis (em cima) e em flavonoides (em baixo) dos diferentes extratos de *Chamaerops humilis* obtidos por maceração. Os valores representam a média \pm o erro padrão de três repetições. No mesmo gráfico, valores seguidos de letras diferentes representam médias significativamente diferentes de acordo com o teste de Duncan ($P < 0,05$).

No geral, os diferentes extratos apresentaram um elevado teor em fenóis, expressos em equivalentes de ácido gálico por grama de extrato, com uma variação de valores entre $344,33 \pm 11,82$ e $1564,88 \pm 29,91 \mu\text{molEAG/g}_{\text{extrato}}$, sendo o valor mais alto obtido para o extrato de sementes e o mais baixo para o extrato de polpa ($P < 0,005$). Segundo Demiray et al. (2009) estes resultados podem ser explicados pela variação da distribuição de metabolitos secundários entre diferentes órgãos da planta. A atividade antioxidante encontra-se geralmente correlacionada com o teor em compostos fenólicos de cada amostra e varia de acordo com cada extrato provavelmente devido a diferentes perfis fitoquímicos. O teste de Pearson comprovou a existência de uma correlação significativa ($P < 0,01$) entre os teores em fenóis totais presentes nos extratos e a

atividade antioxidante avaliada pelos três métodos. Alguns estudos fitoquímicos em extratos de *C. humilis* demonstraram que estes contêm diversos compostos fenólicos como taninos, flavonoides, saponinas, quinonas e cumarinas (Benmehdi, Hasnaoui, Benali & Salhi, 2012; Benahmed-Bouhafoun et al., 2013; Hasnaoui et al., 2013), fundamentando assim os elevados teores em fenóis obtidos para os diferentes extratos em estudo. Contudo, a análise dos resultados deste trabalho deve ser feita com prudência, uma vez que os constituintes dos extratos não são totalmente conhecidos. Além disso, apesar do método colorimétrico F-C ser bastante utilizado para a quantificação de compostos fenólicos não apresenta especificidade para fenóis, ou seja, outras substâncias podem reduzir o reagente F-C, a resposta dos compostos fenólicos face ao reagente F-C depende do número de grupos de fenol que possuem (Singleton et al., 1999).

Em relação às quantidades de flavonoides existentes em cada extrato, obtidas pelo método AlCl_3 , que dá uma indicação da quantidade de flavonoides presentes nas amostras sem a interferência de outros grupos de substâncias fenólicas, principalmente ácidos fenólicos (Funari & Ferro 2006), verifica-se um destaque do extrato foliar com valores de $139,88 \pm 2,38 \mu\text{mol}_{\text{EQ}}/\text{g}_{\text{extrato}}$. Os restantes extratos apresentaram valores mais baixos, por ordem decrescente as sementes ($42,92 \pm 2,99 \mu\text{mol}_{\text{EQ}}/\text{g}_{\text{extrato}}$), a pele ($26,91 \pm 2,20 \mu\text{mol}_{\text{EQ}}/\text{g}_{\text{extrato}}$) e a polpa ($19,48 \pm 0,64 \mu\text{mol}_{\text{EQ}}/\text{g}_{\text{extrato}}$). Apesar dos constituintes dos vários órgãos de *C. humilis* ainda ser um tema pouco investigado, alguns dos estudos já existentes fundamentam estes resultados, nomeadamente o elevado valor de flavonoides no extrato foliar que foi reportado por Williams & Harborne (1973). Estes autores identificaram diversos flavonoides nas folhas de *C. humilis*, designadamente leucoantocianidina (flavonoide monomérico 3,4-diol), flavona C-glicósidos e tricina 5-O-glicósido. Em relação aos frutos foi reportado por Monache et al. (1972) a presença dos flavonoides (+)-epicatequina, (+)-catequina e procianidinas (taninos condensados). Ao contrário do verificado para o teor em fenóis o teste de Pearson indicou a inexistência de correlação entre o teor em fenóis e a atividade antioxidante dos extratos.

No seguimento do estudo de avaliação da atividade biológica e quantificação do teor em compostos fenólicos houve oportunidade de fazer um estudo muito preliminar sobre o perfil fenólico dos diferentes extratos de *C. humilis*. A tabela 1 apresenta os

resultados do perfil fenólico dos extratos de folhas e polpa de *C. humilis* determinado por HPLC-DAD por comparação com padrões puros de compostos fenólicos. Verificou-se a presença de ácidos fenólicos (ácidos hidroxicinâmicos) e flavonoides. No extrato de polpa foram identificados dois compostos diferentes, um ácido hidroxicinâmico, o ácido 3-*O*-cafeoilquínico ($3,77 \pm 0,27$ mg/g_{extrato}) e um flavonoide, (+)-catequina ($0,54 \pm 0,13$ mg/g_{extrato}).

O extrato das folhas contém vários compostos entre eles ácidos hidroxicinâmicos, o ácido 3-*O*-cafeoilquínico, à semelhança do extrato da polpa, e o ácido clorogénico ($2,97 \pm 0,15$ mg/g_{extrato}). Foram também identificados dois tipos de flavonoides, a luteolina-8-*C*-glucósido ($3,88 \pm 0,59$ mg/g_{extrato seco}) e a apigenina 8-*C*-glucósido ($7,16 \pm 1,06$ mg/g_{extrato}), sendo estes os composto maioritários deste extratos. Foram também identificados derivados de luteolina e apigenina pelo método do padrão, comparando com a luteolina e com a apigenina, uma vez que os seus pesos moleculares são similares a estes dois compostos e o espectro característico é semelhante.

Tabela 1. Perfil fenólico de extratos de *Chamaerops humilis* (mg/g_{extrato}) por cromatografia líquida de alta pressão com detetor de matriz de diodo (HPLC-DAD).

	Tempo de retenção	Folhas	Polpa
Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico (1)	9,91	3,77 ± 0,27	3,77 ± 0,27
(+)-catequina (2)	12,35	-	0,54 ± 0,13
Ácido clorogénico (ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico) (3)	17,38	2,97 ± 0,15	-
Orientina (Luteolina-8- <i>C</i> -glucósido) (4)	30,48	3,88 ± 0,59	-
Vitexina (Apigenina 8- <i>C</i> -glucósido) (5)	32,47	7,16 ± 1,06	-
Derivado da Apigenina (6)	38,42	0,98 ± 0,23	-
Derivado da Luteolina (7)	40,94	1,60 ± 0,31	-
Derivado Luteolina (8)	41,45	2,08 ± 0,31	-
Derivado de Apigenina (9)	46,31	1,07 ± 0,33	-
Derivado de Apigenina (10)	48,16	4,68 ± 0,57	-
Derivado de Apigenina (11)	49,66	1,36 ± 0,43	-

“-“ não identificado

Nas seguintes figuras estão representados os espectros UV dos extratos de folhas (figura 8), polpa (figura 9) e sementes (figura 10).

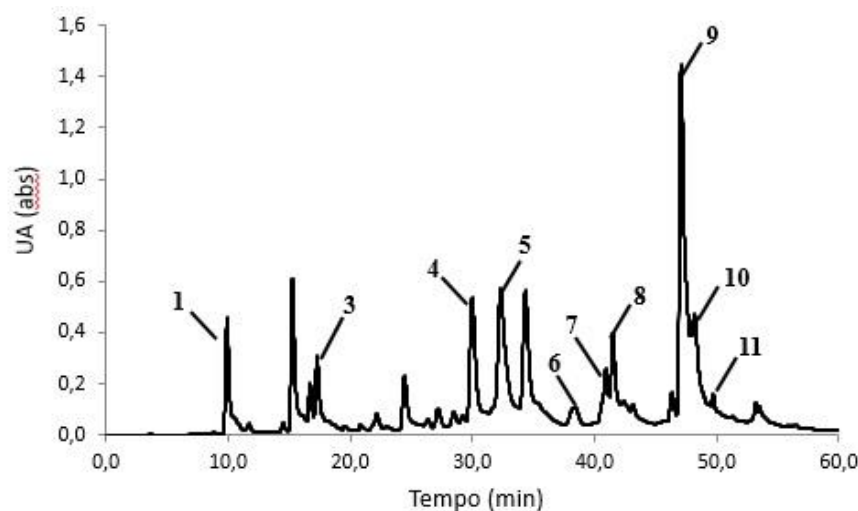


Figura 8. Cromatograma de HPLC para o extrato de folhas de *Chamaerops humilis* ($\lambda = 350$ nm). O número correspondente a cada pico encontra-se descrito na Tabela 1.

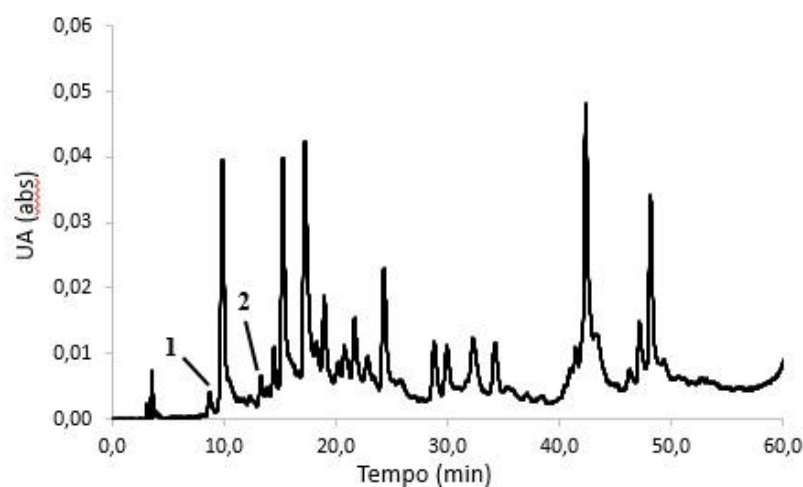


Figura 9. Cromatograma de HPLC para o extrato de polpa de *Chamaerops humilis* ($\lambda = 350$ nm). O número correspondente a cada pico encontra-se descrito na Tabela 1

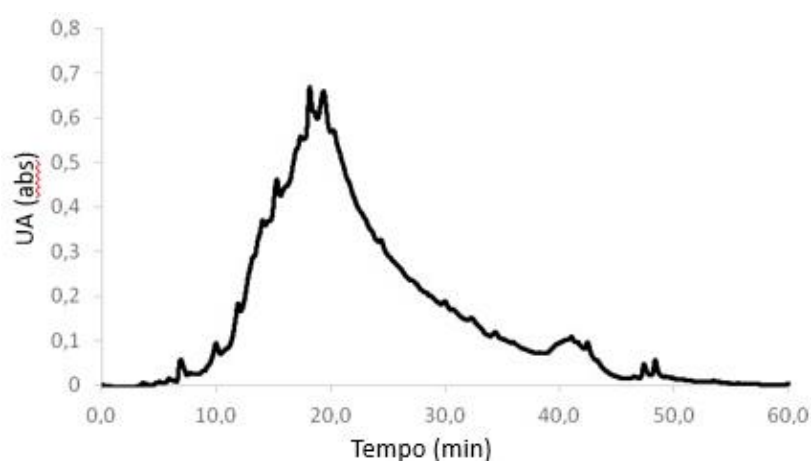


Figura 10. Cromatograma de HPLC para o extrato de sementes de *Chamaerops humilis* ($\lambda = 280$ nm)

Através da análise dos cromatogramas, verifica-se a semelhança entre alguns picos dos espectros UV de folhas e de polpa, indicando que provavelmente têm alguns compostos fenólicos da mesma família (flavonoides e ácidos fenólicos). Verifica-se que há outros compostos que só aparecem num ou noutro cromatograma e com picos de grande intensidade, o que poderá indicar tratar-se de um composto maioritário do extrato. Pela visualização do cromatograma do extrato de sementes verifica-se uma grande lombada entre os tempos de retenção de 15 e 25 min, aproximadamente, que se pensa indicar taninos condensados, uma vez que estes são polímeros do ácido gálgico

ou do ácido elágico que a um comprimento de onda de 280 nm costumam apresentar o mesmo tipo de espectro.

Muitos dos picos presentes nos cromatogramas não foram identificados quanto à família do composto fenólico presente, devido a alguns fatores nomeadamente, alguns picos sofreram variações quando comparados com os compostos puros dos padrões e à falta de padrões para comparação. Os resultados deste estudo preliminar do perfil fenólico estão de acordo com os resultados descritos anteriormente do teor em fenóis e flavonoides totais, uma vez que no caso do extrato de folhas foram detetados inúmeros flavonoides, já nas sementes tal não se verificou, sendo talvez os taninos a causa do elevado teor em compostos fenólicos registado. Estes resultados estão de acordo com os estudos fitoquímicos em extratos desta espécie já referenciados acima.

3.2. Efeito da concentração de metanol e tempo de extração na capacidade antioxidante e teor em fenóis de extratos de semente

Diferentes sistemas de solventes têm sido utilizados para a extração de compostos de material vegetal (Chavan, Shahidi & Naczki, 2001). O rendimento da extração é dependente do solvente e do método de extração (Goli, Barzegar & Sahari, 2004) e este deve permitir uma extração dos compostos de interesse evitando modificações químicas dos compostos (Zuo, Chen & Deng, 2002). Água, misturas aquosas de etanol, MeOH ou acetona são os solventes muito utilizados para extrair compostos antioxidantes (Sun & Ho, 2005). Solventes polares como o MeOH e o etanol são frequentemente empregados para recuperar polifenóis de diferentes plantas (Sultana, Anwar & Ashraf, 2007; Anwar, Ali, Hussain & Shahid, 2009). No entanto, um solvente simples pode não ser capaz de extrair o máximo de compostos fenólicos de todos os tipos de material vegetal. Muitas vezes verifica-se que a combinação de solventes orgânicos com aquosos é mais eficiente para a recuperação de compostos antioxidantes do que os correspondentes solventes puros (Sultana, Anwar & Przybylski, 2009).

Tendo em conta, que o extrato de sementes de *C. humilis* foi o que anteriormente revelou maior capacidade antioxidante e maior teor em fenóis totais, decidiu estudar-se mais detalhadamente a extração a partir deste material vegetal. Têm sido realizados estudos para avaliar o efeito do tempo de extração e concentração de solvente em outras espécies (Goli, Barzegar & Sahari, 2004; Lapornik, Prosek & Wondra 2005; Liyana-Pathirana & Shahidi, 2005; Spigno, Tramelli & Faveri, 2007) relevando que estes afetam a atividade antioxidante. Neste trabalho prepararam-se extratos por maceração durante 60 min e 24 h com MeOH a 0, 50 e 100% e avaliou-se a sua atividade antioxidante e teor em fenóis totais. Os rendimentos de extração variaram entre 8,08 e 14,16%, o valor mais elevado foi obtido com MeOH a 100% para o período de extração 24 h.

Na figura 11 apresentam-se os resultados da atividade antioxidante avaliada pelos métodos DPPH, TEAC e FRAP.

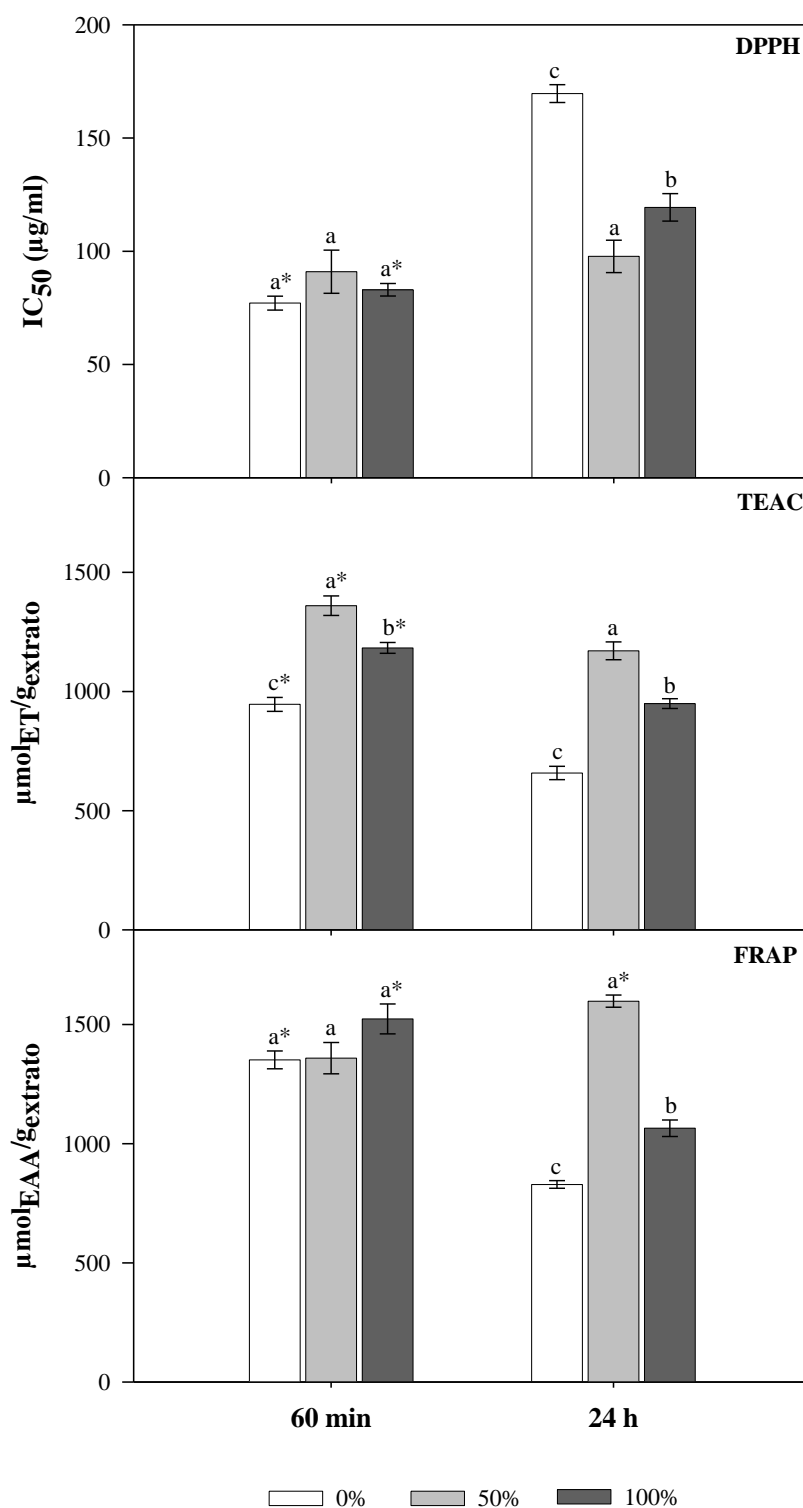


Figura 11. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de sementes de *Chamaerops humilis* obtidos por maceração com MeOH a diferentes concentrações (0, 50 e 100%) durante 60 min e 24 h. Os valores representam a média \pm o erro padrão de três repetições. Para cada período de extração foi efetuada uma comparação estatística entre os solventes, letras diferentes representam médias significativamente diferentes pelo Teste de Duncan ($P < 0,05$). Para cada concentração de MeOH, valores assinalados com * representam médias significativamente diferentes entre os dois períodos de tempo pelo Teste T ($P < 0,05$).

Analisando os resultados da atividade antioxidante verifica-se que, no geral a capacidade para inibir o radical DPPH é mais eficiente quando a extração é realizada durante o período de 60 min e nesse caso é independente da concentração de solvente utilizada. A capacidade para inibir o radical ABTS^{•+} é também superior em extratos obtidos durante um período de extração mais curto (60 min) seja qual for o solvente usado. Além disso, verifica-se que os valores mais elevados são obtidos com MeOH a 50% ($P < 0,05$) tanto a 60 min ($1359,86 \pm 41,16 \mu\text{mol}_{\text{ET}}/\text{g}_{\text{extrato}}$) como a 24 h ($1170,37 \pm 37,41 \mu\text{mol}_{\text{ET}}/\text{g}_{\text{extrato}}$) (figura 11).

Analisando os resultados da capacidade redutora do ferro pelo método FRAP (figura 11) verifica-se que esta é mais elevada ($P < 0,05$) para o período de extração de 60 min quando se utiliza MeOH a 0 e 100%. No entanto, quando se utiliza MeOH a 50% a capacidade redutora é superior ($P < 0,05$) para o período de 24 h.

De um modo geral, verificou-se que os extratos obtidos com MeOH a 50% são os que apresentam maior atividade antioxidante pelos métodos estudados, sendo estes resultados semelhantes aos obtidos em casca de manga, em que a mistura de MeOH com água resultou num maior potencial antioxidante do extrato do que quando o extrato foi produzido com o solvente na forma pura (Dorta, Lobo & Gonzalez, 2012). Além disso, verificou-se que um período de extração mais curto conduziu a melhores resultados o que está de acordo com diversos estudos (Juntachote, Berghofer, Bauer & Siebenhandl, 2006; Chirinos, Rogez, Campos, Pedreschi & Larondelle, 2007; Chan, Lee, Yap, Wan Aida & Ho, 2009) que apontam para que uma extração prolongada conduza a um aumento da possibilidade de ocorrência de oxidação dos compostos fenólicos extraídos, comprometendo assim a capacidade que o extrato tem para reduzir os radicais livres.

É uma prática comum medir o conteúdo em fenóis totais quando se investiga o potencial antioxidante de extratos de plantas, uma vez que vários estudos têm vindo a reportar que plantas com um elevado teor em compostos fenólicos também se revelam como potentes antioxidantes (Maisuthisakul, Suttajit, & Pongsawatmanit, 2007; Razali, Razab, Mat & Aziz, 2008). Na figura 12 estão representados os teores em compostos fenólicos dos vários extratos de sementes de *C. humilis*.

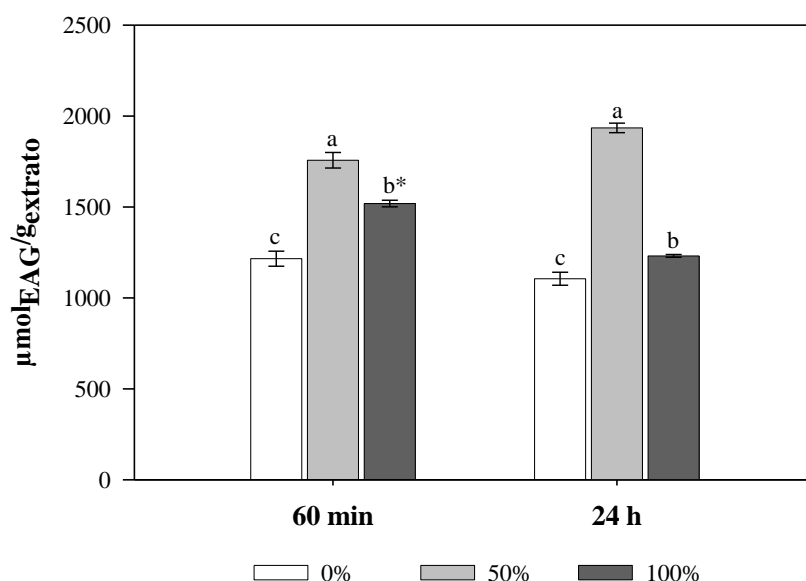


Figura 12. Quantificação do teor em fenóis dos extratos de sementes de *Chamaerops humilis* obtidos por maceração com diferentes solventes a diferentes períodos de tempo. Os valores representam a média \pm o erro padrão de três repetições. Para cada período de extração foi efetuada uma comparação estatística entre os solventes, letras diferentes representam médias significativamente diferentes pelo Teste de Duncan ($P < 0,05$). Para cada concentração de MeOH os valores assinalados com * representam médias significativamente diferentes entre os dois períodos de tempo pelo Teste T ($P < 0,05$).

Na análise do teor em fenóis pelo método F-C observou-se que os valores variaram entre $1105,09 \pm 35,43$ e $1934,49 \pm 26,29$ $\mu\text{mol}_{\text{EAG}}/\text{g}_{\text{extrato}}$ (figura 12) sendo os valores obtidos mais elevados quando o solvente de extração foi o MeOH a 50%, independentemente do tempo de extração. Estes resultados podem ser fundamentados pelo fato de que os compostos fenólicos extraídos com solventes mais polares como MeOH/etanol aquoso geralmente apresentem teores mais elevados de compostos fenólicos do que os extraídos com MeOH/etanol puro (Siddhuraju & Becker, 2003; Anwar et al., 2006; Sultana et al., 2007). Vários estudos têm vindo a demonstrar que os compostos fenólicos influenciam o potencial antioxidante dos extratos vegetais (Katalinic, Milos, Kulisic & Jukic, 2006; Li, Wong, Cheng & Chen, 2008). Assim de uma forma geral os resultados obtidos pelos quatros métodos F-C, DPPH, TEAC e FRAP, demonstram uma certa concordância, uma vez que os extratos com maior teor em fenóis totais foram os que apresentaram maior atividade antioxidante.

3.3. Atividade antioxidante e teor em fenóis de extratos de semente obtidos por extração assistida por ultrassons

A EAU pode ser considerada um método não convencional de extração que vem demonstrando eficiência na extração de compostos bioativos. Vários estudos têm vindo a evidenciar que a aplicação de ultrassons pode aumentar a eficiência da extração através da cavitação acústica e dos efeitos mecânicos sob a amostra (Wu, Lin & Chau, 2001; Rostagno, Palma & Barroso, 2003). A cavitação acústica produzida por ultrassom pode perturbar as paredes celulares facilitando a penetração do solvente no material vegetal permitindo assim que o conteúdo intracelular seja libertado. Outro efeito mecânico do ultrassom é a agitação do solvente utilizado para a extração, aumentando assim a área de contato entre o solvente e os compostos a extrair, permitindo uma maior penetração do solvente no interior da matriz da amostra (Corbin, Fidel, Leclerc, Barakzoy, Sagot, Falguières et al., 2015). Sendo assim, as principais vantagens da EAU incluem a redução do tempo de extração e o reduzido consumo de solvente. Neste trabalho decidiu-se avaliar o seu efeito na atividade antioxidante e teor em fenóis de extratos de sementes de *C. humilis*, tendo sido estudado o efeito da concentração de MeOH (0, 50 e 100%) e a temperatura de extração (30 e 50 °C). Já vem sendo reportado por alguns investigadores (Shotipruk, Kaufman & Wang, 2001; Zhang, Zhang, Yue, Fan, Li & Chen, 2009; Samaram et al., 2015) o efeito da variação da temperatura nesta técnica levando a que este aspecto fosse abordado neste trabalho. Além disso, e uma vez que no ensaio anterior se verificou uma tendência para obter melhores resultados com o período de extração de 60 min, para além deste período usaram-se dois mais curtos, 20 e 40 min. Os extratos obtidos foram avaliados quanto ao teor em fenóis totais e à capacidade antioxidante e os resultados estão resumidos na tabela 2.

Os rendimentos de extração dos vários extratos de sementes obtidos por EAU variaram entre 8,72-10,56% para o MeOH a 100%, 10,96-14,36% para o MeOH a 50% e 6,69-14,25% quando se utilizou apenas água.

Tabela 2. Atividade antioxidante (DPPH, TEAC e FRAP) e teor em fenóis totais em extratos de sementes de *Chamaerops humilis* obtidos por EAU.

MeOH (%)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	DPPH (IC ₅₀ , µg/ml)	TEAC (µmol _{ET} /g _{extrato})	FRAP (µmol _{EAA} /g _{extrato})	F-C (µmol _{EAG} /g _{extrato})
0	30	20	114,57 ± 5,31 a	479,79 ± 46,18 c	620,19 ± 25,46 d	1033,17 ± 41,19 d
		40	134,13 ± 10,18 bc	517,57 ± 11,59 c	711,08 ± 19,14 cd	1134,17 ± 52,99 bc
		60	126,13 ± 3,28 ab	474,12 ± 20,23 c	617,64 ± 25,25 d	1043,85 ± 18,62 cd
	50	20	141,14 ± 3,75 bcd	1032,87 ± 53,81 a	1260,17 ± 91,34 a	1318,10 ± 15,32 a
		40	150,38 ± 5,41 cd	741,50 ± 25,84 b	946,40 ± 41,48 b	1193,16 ± 3,47 b
		60	154,29 ± 3,03 d	681,33 ± 15,68 b	851,60 ± 51,34 bc	1133,36 ± 20,86 bc
50	30	20	124,05 ± 3,78 bc	1091,67 ± 19,96 c	903,13 ± 45,21 c	1648,35 ± 32,64 a
		40	129,99 ± 3,79 cd	1261,62 ± 52,78 b	1076,90 ± 28,39 ab	1550,91 ± 25,00 ab
		60	113,65 ± 0,69 a	1411,05 ± 12,71 a	1162,33 ± 53,87 a	1590,60 ± 75,04 ab
	50	20	115,35 ± 1,79 ab	1217,47 ± 45,98 b	1147,49 ± 15,92 a	1313,46 ± 23,21 c
		40	134,76 ± 0,81 d	1160,08 ± 42,28 bc	1138,03 ± 36,92 a	1493,40 ± 31,57 b
		60	126,68 ± 5,18 cd	1164,48 ± 18,84 bc	991,16 ± 56,82 bc	1491,98 ± 40,70 b
100	30	20	84,78 ± 1,65 a	1292,03 ± 45,09 a	1327,16 ± 66,69 b	1854,86 ± 30,57 ab
		40	93,65 ± 4,03 ab	1412,73 ± 35,36 a	1398,47 ± 27,15 ab	1706,05 ± 47,59 bc
		60	107,09 ± 4,71 c	1400,50 ± 18,95 a	1235,97 ± 27,65 b	1705,49 ± 37,12 bc
	50	20	96,46 ± 3,56 b	1350,62 ± 124,65 a	1385,56 ± 78,32 ab	1818,69 ± 47,04 ab
		40	88,45 ± 2,07 ab	1462,12 ± 62,83 a	1567,39 ± 67,34 a	1885,91 ± 52,83 a
		60	113,17 ± 0,91 c	1398,86 ± 51,93 a	1276,00 ± 64,26 b	1567,32 ± 63,72 c
Solvente			***	***	***	***
Temperatura			***	***	***	ns
Tempo			***	ns	**	**
Solvente × Temperatura × Tempo			ns	ns	**	***

Os valores representam a média ± o erro padrão de três repetições. Para cada variável e solvente de extração valores com letras diferentes representam médias significativamente diferentes pelo Teste de Duncan (P <0,05). ns, indica não significativo, ***, ** e *, indica significativo para P<0,001, P<0,01 e P<0,05, respetivamente (ANOVA tri-fatorial).

Em relação aos resultados da atividade antioxidante, verificou-se que todos os extratos analisados, independentemente das condições de extração usadas, apresentaram capacidade considerável para inibir os radicais DPPH e ABTS, e para reduzir o ferro ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$). Os valores de IC_{50} obtidos com o método DPPH variaram entre $84,78 \pm 1,65$ e $154,29 \pm 3,03 \mu\text{g/ml}$; os valores obtidos pelo TEAC variam entre $474,12 \pm 20,23$ e $1462,12 \pm 62,83 \mu\text{mol}_{\text{ET}}/\text{g}_{\text{extrato}}$ e os obtidos pelo FRAP entre $1567,39 \pm 67,34$ e $617,64 \pm 25,25 \mu\text{mol}_{\text{EAA}}/\text{g}_{\text{extrato}}$ (tabela 2).

Os resultados obtidos foram sujeitos a análise de variância para avaliar o efeito dos três fatores de extração estudados (solvente, temperatura e tempo). Verificou-se que quando a atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos DPPH e FRAP os resultados foram significativamente influenciados pelos três fatores estudados, enquanto os resultados do método TEAC foram apenas influenciados pelo solvente e temperatura de extração. Independentemente dos outros fatores, a capacidade antioxidante avaliada pelos três métodos foi superior nos extratos obtidos com MeOH a 100% e inferior nos extratos aquosos. Além disso, de um modo geral também foram os períodos de extração mais curtos que permitiram obter os melhores resultados. O efeito da temperatura variou consoante o método, os resultados do DPPH foram melhores em extratos obtidos a 30°C que a 50°C , verificando-se o contrário para os resultados do TEAC e FRAP.

Em geral, todos os extratos apresentaram elevados teores em compostos fenólicos, expressos em equivalentes de ácido gálico por grama de extrato, com uma variação de valores entre $1033,17 \pm 41,19$ e $1885,91 \pm 52,83 \mu\text{mol}_{\text{EAG}}/\text{g}_{\text{extrato}}$. Os resultados obtidos com este método (F-C) foram significativamente influenciados pelo solvente ($P < 0,001$), tempo de extração ($P < 0,01$) e interação dos três fatores estudados ($P < 0,001$). Independentemente das outras variáveis testadas, os melhores resultados foram obtidos com MeOH a 100% seguido de MeOH a 50%, ou seja, verificou-se que o teor em fenóis totais decresceu com o incremento de água no solvente. Além disso, períodos mais curtos (20 e 40 min) foram mais eficientes.

Embora a EAU esteja a ser extensivamente utilizada na extração de compostos vegetais bioativos, foi aplicada pela primeira vez em *C. humilis* neste trabalho. De facto, esta técnica revelou-se eficiente na extração de compostos fenólicos com atividade antioxidante. Utilizando a EAU verificou-se que o MeOH puro foi mais eficiente que a solução MeOH/água (50:50, v/v), ao contrário do verificado quando se utilizou a maceração como técnica de extração.

Quanto às extrações em que foi utilizada apenas água como solvente, verificam-se atividades antioxidantes mais baixas, uma vez que os compostos fenólicos extraídos também foram em menor quantidade do que com o uso do MeOH. Este resultado pode ser explicado pelo facto de que quando se utiliza água como solvente de extração a concentração de compostos bioativos em solução seja menor do que com outro solvente, refletindo-se assim na sua atividade (Franco, Sineiro, Rubilar, Sánchez, Jerez, Pinelo et al., 2008).

Uma das principais vantagens da EAU é a redução do tempo de extração. Neste trabalho comprovou-se que a utilização de períodos curtos é o suficiente para extrair elevada quantidade de compostos fenólicos com atividade antioxidante de *C. humilis*. Estes resultados estão em concordância com os reportados por Porto et al. (2013) na extração de compostos fenólicos de sementes de *Vitis vinifera* L. por EAU em que, utilizando períodos curtos de tempo o teor total em fenóis alcançado era maior do que quando prologavam o tempo de extração. Embora, de um modo geral, o aumento da temperatura de extração não incrementasse o teor em fenóis, a atividade antioxidante avaliada pelos métodos TEAC e FRAP foi superior quando se utilizou a temperatura mais elevada. Este efeito positivo do aumento da temperatura de extração foi já anteriormente descrito por Ma et al. (2008) em extratos de pele de *Citrus unshiu* Marc. De fato, a aplicação de calor ao meio de extração e movimentos de agitação mecânica na amostra podem facilitar a recuperação de antioxidantes, aumentado assim a atividade antioxidante do extrato (Wang & Weller, 2006).

A atividade antioxidante está normalmente relacionada com a quantidade de compostos fenólicos nos extratos e varia provavelmente de acordo com os diferentes perfis fitoquímicos de cada extrato. Extratos com maior quantidade de compostos fenólicos e flavonoides, em geral mostram maior atividade antioxidante e boas correlações foram reportadas para esses parâmetros (Alali, Tawaha, El-Elimat, Syouf, El-Fayad, Abulaila et al., 2007). Uma correlação positiva entre compostos fenólicos e antioxidantes foi previamente comprovada em extratos metanólicos e aquosos de outras plantas (Alali et al., 2007; Zubia, Fabre, Kerjean, Lann, Stiger-Pouvreau, Fauchon et al., 2009). Também neste trabalho foi possível comprovar a relação entre o teor em fenóis e a atividade antioxidante dos extratos.

4. Conclusões e Perspetivas Futuras

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar, pela primeira vez, o potencial biológico e o teor em compostos fenólicos de diferentes extratos (folhas, polpa, pele e sementes) da espécie *C. humilis*. Foram testadas várias metodologias *in vitro* para avaliar a capacidade antioxidante e a atividade inibitória de enzimas relevantes para o tratamento da DA e PA (AChE, BChE e TYR). Observou-se que todos os extratos apresentam elevada atividade biológica, embora o extrato obtido a partir de sementes se tenha destacado como o mais promissor. Verificou-se a existência de relação entre o teor em compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante dos diferentes extratos. A análise preliminar dos extratos por HPLC-DAD indica contudo, a existência de diferentes grupos de compostos fenólicos nos extratos das diferentes partes da planta analisadas.

Neste trabalho foi ainda avaliado o efeito de várias condições de extração no teor em fenóis e atividade antioxidante de extratos de sementes. Verificou-se que quando foi utilizada a técnica de maceração houve uma tendência para se obterem melhores resultados utilizando MeOH a 50%, enquanto, na técnica EAU o solvente que elevou os resultados foi o MeOH a 100%. Os extratos aquosos foram os menos promissores em termos de teor em fenóis e capacidade antioxidante. Além disso, de um modo geral, períodos curtos de extração são suficientes para extrair grande quantidade de compostos com atividade antioxidante de sementes desta espécie.

Os resultados obtidos são muito promissores e justificam a continuidade da investigação, que deverá incidir sobretudo nos seguintes pontos:

- testar outros métodos como o método de *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC) para uma mais completa análise antioxidante, devido à complexidade dos compostos antioxidantes e à diversidade de radicais livres;
- análise mais detalhada da composição química dos extratos;
- estudo detalhado para identificar quais os compostos fenólicos com potencial terapêutico;
- realização de testes *in vivo* para testar o mecanismo de ação dos compostos fenólicos.

Em resumo, os extratos de *C. humilis*, em especial o obtido a partir de sementes, apresentaram elevada atividade antioxidante e capacidade de inibir os enzimas envolvidos nas doenças neurodegenerativas como a DA e a DP, apresentando potencial para aplicação na indústria farmacológica, cosmética e alimentar.

5. Referências Bibliográficas

Abbas, F.M.A., Foroogh, B., Liong, M.T., Azhar, M.E. (2008). Multivariate Statistical Analysis of antioxidants in dates (*Phoenix dactylifera*). *International Food Research Journal* 15:193-200.

Afonso M.R.L., McMurtrie M. (1991). *Plantas do Algarve, Serviço Nacional de Parques, Reservas e Conservação da Natureza*, Lisboa.

Alali, F., Tawaha, K., El-Elimat, T., Syouf, M., El-Fayad, M., Abulaila, K., Nielsen, S., Wheaton, W., Falkinham, J., Oberlies, N. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of aqueous and methanol extracts of Jordanian plants: AnICBG project. *Natural Products Research* 21:1121-1131.

Allali, H., Benmehdi, H., Dib, M.A., Tabti, B., Ghalem, S., Benabadji, N. (2008). Phytotherapy of Diabetes in West Algeria. *Asian Journal of Chemistry* 20(4):2701-2710.

Almeida, R.B., Camarato, J.L., Navarro, D.F., Parker, Y.K., Ikegaki, M., Junior, V.A.K. (1997). Determinação de flavonoides totais em amostras de própolis. *Ciências Biológicas e da Saúde* 3:33-41.

Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., Weil, J.A. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry* 84:551-562.

Andersen, J.K. (2004). Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence. *Nature Reviews Neuroscience* 5:18-25.

Anderson, K.J., Teuber, S.S., Gobeille, A., Cremin, P., Waterhouse, A.L., Steinberg, F.M. (2001). Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation. Biochemical and molecular action of nutrients. *Journal of Nutrition* 131:2837–2842.

Anwar, F., Ali, M., Hussain, A.I., Shahid, M. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds from Pakistan. *Flavour and Fragrance Journal* 24:170-176.

- Anwar, F., Jamil, A., Iqbal, S., Sheikh, M.A. (2006). Antioxidant activity of various plant extracts under ambient and accelerated storage of sunflower oil. *Grasas Aceites Sevilla* 57:189-197.
- Ariga. T. (2004). The antioxidative function, preventive action on disease and utilization of proanthocyanidins. *Biofactors* 21:197-201.
- Arts I.C.W., Hollman P.C.H. (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American Journal of Clinical Nutrition* 81:317-325.
- Asanuma M., Miyazaki I., Ogawa, N. (2003). Dopamine or L-DOPA induced neurotoxicity: the role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research* 5:165–176.
- Augustyniak, A., Bartosz, G., Ipak, A.C., Duburs, G., Horakova, L., Uczaj, W., Majekova, M., Odysseos, A.D., Rackova, L., Skrzydlewska, E., Stefek, M., Trosova, M., Tirzitis, G., Venskutonis, P.R., Viskupicova, J., Vraka, P.S., Zarkovic, N. (2010). Natural and synthetic antioxidants: An updated overview. *Free Radical Research* 44 (10):1216–1262.
- Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, S.J., Das, D.K., Ray, S.D., Kuszynski, C.A., Joshi, S.S., Pruess, H.G. (2000). Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology* 148:187-197.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99:191-203.
- Barreiros, A.L.B.S, David, J.M., David, J.P. (2006). Oxidative stress: Relations between the formation of reactive species and the organism's defense. *Química Nova* 29(1):113-123
- Beghalia, M., Ghalem, S., Allali, H., Belouatek, A., Marouf, A. (2008). Inhibition of calcium oxalate monohydrate crystal growth using Algerian medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research* 2:66-70.
- Bellakhdar, J., Claisse, R., Fleurentain, J., Younos, C. (1991). Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoeia. *Journal of Ethnopharmacology* 35:123-143.

- Benahmed-Bouhafsoun, A., Djied, S., Mouzaz, F., Kaid-Harche, M. (2013). Phytochemical composition and *in vitro* antioxidante activity of *Chamaerops humilis* L. extracts. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5:741-744.
- Benmehdi, H., Hasnaoui, O., Benali, O., Salhi, F. (2012). Phytochemical investigation of leaves and fruits extracts of *Chamaerops humilis* L. *Journal of Materials and Environmental Science* 3:320-237.
- Benzi, G., Moretti, A. (1998). Is there a rationale for the use of acethylcholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer's disease? *European Journal of Pharmacology* 346:1-13.
- Berg, V.D.R., Haenen, G.R.M.M., Berg, V. D. H., Vijgh, V. D. W., Bast, A. (2000). The predictive value of the antioxidant capacity of structurally related flavonoids using the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. *Food Chemistry* 70(3):391-395.
- Berker, K.I., Güçlü, K., Tor, I., Apak, R. (2007). Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta* 72:1157-1165.
- Biglari, F., AlKarkhi, A.F.M., Easa, A.M. (2008). Antioxidant activity and phenolic contente of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran. *Food Chemistry* 107:1636-1641.
- Bimakr, M., Rahman, R., Taip, F. S., Adzahan, N. M., Sarker, M. Z. I., Ganjloo, A. (2012). Optimization of ultrasound-assisted extraction of crude oil from winter melon (*Benincasa hispida*) seed using response surface methodology and evaluation of its antioxidant activity, total phenolic content and fatty acid composition. *Molecules* 17:11748 – 11762.
- Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181:1199–1200.
- Boots, A.W., Haenen, G.R., Bast, A. (2008). Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical, *European Journal of Pharmacology* 585:325-337.

- Bonvehí, J.S., Coll, F.V.V. (1994). Phenolic composition of propolis from China and South America. *Zeitschrift fur Naturforschung* 49(11/12):712-718.
- Bonvehí, J.S., Coll, F.V.V., Jordá, R.E. (1994). The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. *Journal of the American Oil Chemist's Society* 71(5):529-532.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science Technology* 28:25–30.
- Carocho, M., Ferreira, I.C.F.R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology* 51:15-25.
- Chan, S.W., Lee, C.Y., Yap, C.F., Wan Aida, W.M., Ho, C.W. (2009). Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. *International Food Research Journal* 16:203-219.
- Chang, T.-S. (2009). An update review of tyrosinase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences* 10:2440-2475.
- Chavan, U. D., Shahidi, F., Naczki, M. (2001). Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. *Food Chemistry* 75:509–512.
- Chen, J.S., Wei, C., Marshall, M.R. (1991). Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39:1897–1901.
- Cheng, Z., Su, L., Moore, J., Zhou, K., Luther, M., Yin, J.J., Yu, L.L. (2006). Effect of postharvest treatment and heat stress on availability of wheat antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:5623-5629.
- Cheung, Y.-C., Siu, K.-C., Wu, J.-Y. (2013). Kinetic Models for Ultrasound-Assisted Extraction of Water-Soluble Components and Polysaccharides from Medicinal Fungi. *Food and Bioprocess Technology* 6(10):2659-2665.
- Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R., Larondelle, Y. (2007). Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua

(*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers. *Separation and Purification Technology* 55(2):217-225.

Chung, Y.C., Chang, C.T., Chao, W.W., Lin, C.F., Chou, S.T. (2002). Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:2454-2458.

Cicerale, S., Lucas, L., Keast, R. (2010). Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *International Journal of Molecular Sciences* 11:458-479.

Cipak, G.A., Lovakovic, T., Zarkovic, N. (2010). Oxidative stress and antioxidants: biological response modifiers of oxidative homeostasis in cancer. *Period Biologorum* 112(4).

Cipak, G.A., Jaganjac, M., Tehlivets, O., Kohlwein, S.D., Zarkovic, N. (2008). Adaptation to oxidative stress induced by polyunsaturated fatty acids in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta* 2008 1781:283-287.

Clark, C.M. (2000). Clinical manifestation and diagnostic evaluation of patients with Alzheimer's disease, in *Neurodegenerative Dementias: Clinical Features and Pathological Mechanisms*, Clark C. M. and Trojanowski J. Q., eds. McGraw-Hill, New York, 95–114.

Corbin, C., Fidel, T., Leclerc, E.A., Barakzoy, E., Sagot, N., Falguières, N., Renouard, S., Blondeau, J-P., Ferroud, C., Doussot, J., Lainé, E., Hano, C. (2015). Development and validation of an efficient ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry* 26:176–185.

Dawidowicz, A.J., Wianowska, D., Olszowy, M. (2012). On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity). *Food Chemistry* 13:1037-1043.

Demiray, S., Pintado, M., Castro, P. (2009). Evaluation of phenolic profiles and antioxidant activities of Turkish medicinal plants: *Tilia argentea*, *Crataegi folium* leaves and *Polygonum bistorta* roots. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 54:312-317.

Dias, V., Junn, E., Mouradian, M.M. (2013). The Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *Journal of Parkinson's Disease* 3(4):461–491.

- Dorta, E., Lobo, M.G., Gonzalez, M. (2011). Reutilization of mango by-products: study of the effect of extraction solvent and temperature on their antioxidant properties. *Journal of Food Science* 77:80–88.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. Jr., Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7:88-95.
- Fawole, O.A., Amoo, S.O., Ndhlala, A.R., Light, M.E., Finnie, J.F., Van Staden, J. (2010). Anti-inflammatory, anticholinesterase, antioxidant and phytochemical properties of medicinal plants used for pain-related ailments in South Africa. *Journal of Ethnopharmacology* 127:235-241.
- Fearon, I.M., Faux, S.P. (2009). Oxidative stress and cardiovascular disease: Novel tools give free radical insight. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 47:372–381.
- Felician, O., Sandson, T.A. (1999). The neurobiology and pharmacotherapy of Alzheimer's disease. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* 11:19-31.
- Ferreira, I.C.F.R., Abreu, R.M.V. (2007). Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. *Bioanálise - Sociedade Portuguesa de BioAnalistas da Saúde*, Ano IV, n.º 2, Julho/Dezembro.
- Ferreira, A.L. Matsubara, L.S. (1997). Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira* 43(1):61-68.
- Ferreira, A., Proença, C., Serralheiro, M.L.M., Araújo, M.E.M. (2006). The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology* 108:31-37.
- Franco, D., Sineiro, J., Rubilar, M., Sánchez, M., Jerez, M., Pinelo, M., Costoya, N., Núñez, M.J. (2008). Polyphenols from plant materials: extraction and antioxidant power. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 7:3210-3216.
- Frankel, E. N. (2005). Lipid oxidation (2nd ed.). *England: The Oily Press*.

- Folin, O., Ciocalteu, V. (1927). On Tyrosine and Tryptophane Determinations in Proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 73:627-650.
- Funari, C.S., Ferro, V.O. (2006). Análise de própolis. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 26:171-178.
- Gaamoussi, F., Israili, Z.H., Lyoussi, B. (2010). Hypoglycemic and Hypolipidemic Effects Of An Aqueous Extract Of *Chamaerops Humilis* Leaves In Obese, Hyperglycemic And Hyperlipidemic *Meriones Shawi* Rats, Pakistan. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 23(2):212-219.
- Goli, A. H., Barzegar, M., Sahari, M. A. (2004). Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry* 92:521–525.
- Graf, B.A., Milbury, P.E., Blumberg, J.B. (2005). Flavonols, flavonones, flavanones and human health: Epidemiological evidence. *Journal of Medicinal Food* 8:281-290.
- Greggio, E., Bergantino, E., Carter, D., Ahmad, R., Costin, G-E., Hearing, V.J., Clarimon, J., Singleton, A., Eerola, J., Hellstrom, O., Tienari, P.J., Miller, D.W., Beilina, A., Bubacco, L., Cookson, M.R. (2005). Tyrosinase exacerbates dopamine toxicity but is not genetically associated with Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry* 93:246–256.
- Gülçin, I., Oktay, M., Kufrevioglu, O.I., Aslan, A. (2002). Determination of antioxidant activity of lichen *Cetraria islandica* (L.). *Journal of Ethnopharmacology* 79:325-329.
- Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *The American Journal of Medicine* 91:14-22.
- Halliwell, B. (2011). Free radicals and antioxidants – *quo vadis?* *Trends Pharmacol. Sci.* 32(3):125–130.
- Halliwell, B., Clement, M.V., Long, H. (2000). Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letters* 486:10-13.
- Handa, S.S., Khanuja, S.P.S., Longo, G., Rakesh, D.D. (2008). Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. *International Centre for Science and High Technology* 22-70.

- Hasnaoui, O., Benali, O., Bouazza, M., Benmehdi, H. (2013). Ethnobotanical approaches and phytochemical analysis of *Chamaerops humilis* L. (Arecaceae) in the area of Tlemcen (western Algeria). *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 4:910-918.
- Hebert, L.E., Scherr, P.A., Beckeff, L.A. (1995). Age-specific incidence of Alzheimer's disease in a community population. *Journal of the American Medical Association* 273: 1354-1359.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:1841-1856.
- Hyoudou, K., Nishikawa, M., Kobayashi, Y., Umeyama, Y., Yamashita, F., Hashida, M. (2006). PEGylated catalase prevents metastatic tumor growth aggravated by tumor removal. *Free Radical Biology and Medicine* 41:1449-1458.
- Ingkaninan, K., Temkitthawon, P., Chuenchom, K., Yuyaem, T., Thongnoi, W. (2003). Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *Journal of Ethnopharmacology* 89:261–264.
- Jaen, J.C., Gregor, V.E., Lee, C., Davis, R., Emmerling, M. (1996). Acetylcholinesterase Inhibition by Fused Di-Hydroquinazoline compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 6(6):737–742.
- Juntachote, T., Berghofer, E., Bauer, F., Siebenhandl, S. (2006). The application of response surface methodology to the production of phenolic extracts of lemon grass, galangal, holy basil and rosemary. *International Journal of Food Science and Technology* 41(2):121-133.
- Kannan, K., Jain, S.K. (2000). Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* 7(27): 153-163.
- Karadag, A., Ozcelik, B. Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods* 2:41-60.
- Knapp, M.J, Knopman, D.S., Solomon, P.R., Pendlebury, W.W., Davis, C.S., Gracon, S.I. (1994). A 30-week randomized controlled trial of high-dose tacrine in patients with Alzheimer's disease. The Tacrine study group. *The Journal of the American Medical Association* 271:985-991.

- Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., Jukic, M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry* 94:550-557.
- Keskin, C. (2015). Antioxidant, anticancer and anticholinesterase activities of flower, fruit and seed extracts of *Hypericum amblysepalum*. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 16(7):2763-2769.
- Khanavi, M., Saghari, Z., Mohammadirad, A., Khademi, R., Hadjiakhoondi, A., Abdollahi, M. (2009). Comparison of antioxidant activity and total phenols of some date varieties. *DARU* 17:104-109.
- Kim, Y.J., Uyama, H. (2005). Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and molecular life sciences* 62(15):1707-23.
- Kokwaro, J.O. (1976). Medicinal Plants of East Africa. East African Literature Bureau, Nairobi, Kenya.
- Krempin, J. (1995). Popular Palms, Krempin Books, Australia.
- Lapornik, B., Prosek, M., Wondra, A.G. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering* 71(2):214-222.
- Lesage, S, Brice, A. (2009). Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Human Molecular Genetics* 18(R1):48-59.
- Li, H-B, Wong, C-C, Cheng, K-W, Chen, F. (2008). Antioxidant properties *in vitro* and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT- Food Science and Technology* 41:385-390.
- Liu, S.C., Lin, J.T., Wang, C.K., Chen, H.Y., Yang, D.J. (2009). Antioxidant properties of various solvent extracts from lychee (*Litchi chinensis* sonn.) flowers. *Food Chemistry*. 114:577-81.
- Liyana-Pathirana, C., Shahidi, F. (2005). Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry* 93(1):47-56.

- Loizzo, M.R., Tundis, R., Menichini, F. (2012). Natural and synthetic tyrosinase inhibitors as antibrowning agents: An update. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 11:378-398.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193:265-275.
- Loziene, K., Venskutonis, P.R., Sipailiene, A. Labokas, J. (2007). Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. *Food Chemistry* 103:546-559.
- Ma, Y.Q., Ye, X.Q., Fang, Z.X., Chen, J.C., Xu, G.H., Liu, D.H. (2008). Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts from ultrasonic treatment of Satsuma Mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:5682-5690.
- Maestri, D. M., Nepote, V., Lamarque, A. L., Zygadlo, J. A. (2006). Natural products as antioxidants. *Phytochemistry: Advances in research* 105-135.
- Maisuthisakul, P., Suttajit, M., Pongsawatmanit, R. (2007). Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chemistry* 100:1409–1418.
- Makahleh, A., Saad, B., Bari, M.F. (2015). Synthetic phenolics as antioxidants for food preservation. *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 79:727-747.
- Mancuso, C., Bates, T., Butterfi, D.A., Calafato, S., Cornelius, C., Lorenzo, A., Kostova, A.T.D, Calabrese, V. (2007). Natural antioxidants in Alzheimer's disease *Expert Opinion on Investigational Drugs* 16(12):1921-1931.
- Martins, L., Mourato, M. (2008). Alterações no metabolismo de plantas em meios contaminados por metais pesados: stresse oxidativo. *Revista Agros* 8.
- Masuda, T., Yamashita, D., Takeda, Y., Yonemori, S. (2005). Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 69(1):197-201.

- Mata, A.T., Proença, C., Ferreira, A.R., Serralheiro, M.L.M., Nogueira, J.M.F., Araújo, M.E.M. (2007). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry* 103:778-786.
- Merlo, M.E., Aleman, M.M., Cabello, J., Penas, J. (1993). On the mediterranean fan palm (*Chamaerops humilis*). *Principes* 37:151-158.
- Miguel, M., Bouchmaaa, N., Aazza, S., Gaamoussi, F., Lyoussi, B. (2014). Antioxidant, anti-inflammatory and anti-acetylcholinesterase activities of eleven extracts of moroccan plants. *Fresenius Environmental Bulletin* 23(6):1-14.
- Miles, E.A, Rice-Evans, C. (1994). Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods of Enzymology* 234:279-293.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 26(2):211–219.
- Moller, I., Jensen, P., Hansson, A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* 58:459-481.
- Monache, F., Ferrari, F., Poce-Tucci, A., Marini-Bettolo, G.B. (1972). Catechins with (+)-epi-configuration in nature. *Phytochemistry* 11:2333–2335.
- Mota, M.P., Figueiredo, P., Duarte, J.A. (2004). Teorias biológicas do envelhecimento. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto* 4:81-110.
- Munoz, P., Huenchuguala, S., Paris, I., Segura-Aguilar, J. (2012). Dopamine oxidation and autophagy. *Parkinsons Disease* 920-953.
- Nehdi, I.A., Mokbli, S., Sbihi, H., Tan, C.P., Al-Resayes, S.I. (2014). *Chamaerops humilis* L. var. *argentea* André date palm seed oil: a potencial dietetic plant product. *Journal of Food Science* 79(4):534-539.
- Neves, J.M., Matos, C., Moutinho, C, Gomes, L.R. (2009). Actividade antioxidante e avaliação *in vitro* da citotoxicidade de extratos aquosos de folha de *Mentha x Piperita*. *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde* 344-354.
- Niki, E. (2010). Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Biology and Medicine* 49:503-515.

- Oboh, G., Akinyemi, A.J., Omojokun, O.S., Oyeleye, I. (2014). Anticholinesterase and antioxidative properties of aqueous extract of *Cola acuminata* seed *in vitro*. *International Journal of Alzheimers Disease* 1-8.
- Orhan, I., Kartal, M., Naz, Q., Ejaz, A., Yilmaz, G., Kan, Y.K.B., Sener, B., Choudhary, M.I. (2007). Antioxidant and anticholinesterase evaluation of selected Turkish *Salviaspecies*. *Food Chemistry* 103:1247–1254.
- Ordoñez, A.A.L., Gomez, J.D., Vattuone, M.A., Isla, M.I. (2006). Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. *Food Chemistry* 97(3):452-458.
- Oskoueian, A., Haghighi, R.S., Ebrahimi, M., Oskoueian, E. (2012). Bioactive compounds, antioxidant, tyrosinase inhibition, xanthine oxidase inhibition, anticholinesterase and anti inflammatory activities of *Prunus mahaleb* L. seed. *Journal of Medicinal Plants Research* 6:225-233.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:4619-4626.
- Pandey, K.B., Rizvi, S.I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2(5):270–278.
- Pakkenberg, B., Moller, A., Gundersen, H.J., Dam, A.M., Pakkenberg, H. (1991). The absolute number of nerve cells in substantia nigra in normal subjects and in patients with Parkinson's disease estimated with an unbiased stereological method. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 54(1):30-3.
- Pereira, D., Valentão, P., Pereira, J., Andrade, P. (2009). Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules* 14:2202-2211.
- Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Tabernero, M., Diaz-Rubio, M., Serrano, J., Goñi, I., Saura-Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant food, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. *Food Research International* 41:274-285.
- Perry, N.S.L., Houghton, P.J., Theobald, A., Jenner, P., Perry, E.K. (2000). *In-vitro* inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *Salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 52:895-902.

- Perry, E.K., Pickering, A.T., Wang, W.W., Houghton, P.J., Perru, N.S. (1999). Medicinal plants and Alzheimer's disease: from ethnobotany to phytotherapy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 51:527-534.
- Piantino, C.R., Aquino, F.W.B. (2008). Supercritical CO₂ extration of phenolic compounds from *Baccharis dracunculifolia*. *Journal of Supercritical Fluids* 47:209-214.
- Pinto J.R., Pernes S. (2010), Guia da Flora, Universidade do Algarve.
- Porto, C., Porretto, E., Decorti, D. (2013). Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry* 20:1076-1080.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:4290-4302.
- Racchi, M., Mazzucchelli, M., Porrello, E., Lanni, C., Govoni, S. (2004). Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules. *Pharmacology Research* 50:441-451.
- Razali, N., Razab, R., Mat, J.S., Abdul, A.A. (2008). Radical scavenging and reducing properties of extracts of cashew shoots (*Anacardium occidentale*). *Food Chemistry* 111:38-44.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26:1231-1237.
- Rostagno, M.A., Palma, M., Barroso, C.G. (2003). Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A* 1012(2):119-128.
- Sadeghi, Z., Kuhestani, K., Abdollahi, V., Mahmood, A. (2014). Ethnopharmacological studies of indigenous medicinal plants of Saravan region, Baluchistan, *Journal of Ethnopharmacology* 153:111-118.

- Sadeghi, Z., Valizadeh, J., Shermeh, O.A. (2015). Antioxidant activity and total phenolic contents of some date varieties from Saravan Region, Baluchistan. *Journal of Medicinal Plants Research* 9(4):78- 83.
- Samaram, S., Mirhosseini, H., Tan, C. P., Ghazali, H. M., Bordbar, S., Serjouie, A. (2015). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of oil from papaya seed by response surface methodology: Oil recovery, radical scavenging antioxidant activity, and oxidation stability. *Food Chemistry* 172:7-17.
- Samaram, S., Mirhosseini, H., Tan, C. P., Ghazali, H. M. (2013). Ultrasound-assisted extraction (UAE) and solvent extraction of papaya seed oil: Yield, fatty acid composition and triacylglycerol profile. *Molecules* 18:12474-12487.
- Schofield, P., Mbugua, D.M., Pell, A.N. (2001). Analysis of condensed tannins: A review. *Animal Feed Science and Technology* 91:21-40.
- Seabra, R.M., Andrade, P.B., Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Bastos, M.L. (2006). Antioxidant compounds extracted from several plant materials. In: Fingerman M, Nagabhushanam R. *Biomaterials from aquatic and terrestrial organisms*. Enfield (NH)USA:Science 115-174.
- Shahidi, F., Zhong, Y. (2005). Antioxidants: regulatory status. *Bailey's industrial oil and fat product* 491-512.
- Shams, A.M.R., Khanavi, M., Hajimahmoodi, M., Jahangiri, M., Hadjiakhoondi (2010). Comparison of Antioxidant Activity and Total Phenol Contents of some Date Seed Varieties. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 9(2):141-146.
- Shi, H., Noguchi, N., Niki, E. (2001). Introducing natural antioxidants. In: Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (eds.). *Antioxidants in food: Practical applications*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- Shotipruk, A., Kaufman, B., Wang, Y. (2001). Feasibility study of repeated harvesting of menthol from biologically viable *Mentha x piperata* using ultrasonic extraction. *Biotechnology Progress* 17:924–928.
- Siddhuraju, P., Becker, K. (2003). Antioxidant properties of various extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree

- (*Moringa oleifera* lam.) leaves. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 51:2144-2155.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 29:152-178.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16:144-158.
- Soler-Rivas, C., Espin, J.C, Wichers, H.J. (2000). An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochemical Analysis* 11:1-9.
- Spigno, G., Tramelli, L., Faveri, D.M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering* 81(1):200-208.
- Sultana, B., Anwar, F., Ashraf, M. (2007). Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules* 14: 2167-2180.
- Sultana, B., Anwar, F., Przybylski, R. (2009). Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica* and *Eugenia jambolana* Lam. Trees. *Food Chemistry* 104:1106-1114.
- Sun, T., Ho, C. (2005). Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chemistry* 90:743-749.
- Taiz, L., Zeiger, E. (1998). *Plant Physiology*, Second Edition, 751-753.
- Tariot, P.N., Solomon, P.R., Morris, J.C., Kershaw, P., Lilienfeld, S., Ding, C., The Galanthamine USA-Study Group (2000). A 5-month, randomized, placebocontrolled trial of galanthamine in AD. *Neurology* 54:2269-2276.
- Tief, K., Schmidt, A., Beermann, F. (1998). New evidence for presence of tyrosinase in substantia nigra, forebrain and midbrain, Brain Research. *Molecular Brain Research* 53:307-310.

- Tundis, R., Bonesi, M., Menichini, F., Loizzo, M.R. (2015). Recent knowledge on medicinal plants as source of cholinesterase inhibitors for the treatment of dementia. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*.
- Vauzour, I.D., Vafeiadou, K., Spencer, J.P. (2007). Inhibition of the formation of the neurotoxin 5-S-cysteinyl-dopamine by polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 362:340–346.
- Venskutonis, P.R. (2004). Food additives: the dilemma of “synthetic or natural”. *Acta Aliment Hung* 33:1-5.
- Wang, L., Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology* 17:300-312.
- Wetwitayaklung, P., Limmatvapirat, C., Phaechamud, T. (2013). Antioxidant and anticholinesterase activities of *Sonneratia caseolaris* extracts. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 75(6):649-656.
- Williams, C.A., Harborne, J.B. (1973). Negatively charged flavones and tricin as chemosystematic markers in the *Palmae*. *Phytochemistry* 12:2417-2430.
- Woisky, R.G., Salantino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultura Research*. 37(2):99-105.
- Wright, J.S., Johnson, E.R., DiLabio, G.A. (2001). Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Journal of the American Chemical Society* 123:1173-1183.
- Wu, J., Lin, L., Chau, F.T. (2001). Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. *Ultrasonics Sonochemistry* 8:347–35.
- Wu, S.J., Chiang, Y.T., Tzeng, W.S., Shyu, Y.T. (2010). Function properties of extracts from albedo tissues of pummel (*Citrus grandis* Osbeck). *Journal of Biotechnology* 150:1–576.
- Yen, G.C., Chen, H.Y. (1995). Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 43: 27-32.

Yoshimura, M., Watanabe, Y., Kasai, K., Yamakoshi, J., Koga, T. (2005). Inhibitory effect of an ellagic acid-rich pomegranate extracts on tyrosinase activity and ultraviolet-induced pigmentation. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 69:2368–2373.

Zengin, G., Uysal, S., Ceylan, R., Aktumsek, A. (2015). Phenolic constituent, antioxidative and tyrosinase inhibitory activity of *Ornithogalum narbonense* L. from Turkey: A phytochemical study. *Industrial Crops and Products* 70:1–6.

Zhang, Q.-A., Zhang, Z.-Q., Yue, X.-F., Fan, X.-H., Li, T., Chen, S.-F. (2009). Response surface optimization of ultrasound-assisted oil extraction from autoclaved almond powder. *Food Chemistry* 116:513–518.

Zhang, Y., Yang, L., Zu, Y., Chen, X., Wu, T., Wang, F., Liu, F. (2010). Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. *Food Chemistry* 118:656-662.

Zubia, M., Fabre, M.S., Kerjean, V., Lann, K.L., Stiger-Pouvreau, V., Fauchon, M., Deslandes, E. (2009). Antioxidant and antitumoural activities of some *Phaeophyta* from Brittany coasts. *Food Chemistry* 116(3):693-701.

Zuo, Y., Chen, H., Deng, Y. (2002). Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, oolong, black and puerh teas using HPLC with a photodiode array detector. *Talanta* 57:307-316.

Websites Consultados:

http://www.plantapalm.com/vpe/virtualtours/sicily/chamaerops_map.gif, acessado a 18 de Abril de 2015.

<http://www.flora-on.pt/#/h8hAi>, acessado a 30 de Agosto de 2015.